

GIOVANA DE SOUZA MAGNANI

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CANA- DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Curitiba

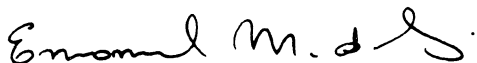
2005

TERMO DE APROVAÇÃO

GIOVANA DE SOUZA MAGNANI

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre no programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Cyntia Maria Fadel-Picheth
Departamento de Patologia Médica – UFPR

Curitiba, 23 de março de 2005.

Dedico os meus melhores resultados às pessoas que eu mais amo: Pai, Mãe, Lipe, Cris e Leo. Sem vocês, nada faz sentido... Com vocês, tudo é possível... Por vocês, tudo vale a pena ...

AGRADECIMENTOS

- À coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.
- À CAPES e ao CNPq.
- Ao Prof. Fabio de Oliveira Pedrosa, por permitir que eu trabalhasse em seu laboratório, pelo seu exemplo e pela análise desse trabalho.
- Aos meus orientadores professores Emanuel Maltempi de Souza e Leonardo Magalhães Cruz, por me aceitarem como orientanda, pela orientação constante e atenciosa durante esses dois anos e pela correção deste trabalho.
- À Profa Cyntia Fadel Pichet, pela sua contribuição fundamental ao meu trabalho, pelo incentivo constante e pela correção desse trabalho.
- A Dra. Claudia Martim Didonet, por confiar a mim as suas estirpes.
- Aos Funcionários e amigos D. Julieta, D. Roseli Prado e Valter Baura, funcionários e amigos queridos.
- Ao André Luis F. Souza, pela sua amizade, por nossas “conversas” de corredor, e principalmente por me ajudar nos ensaios da nitrogenase.
- Aos amigos, em especial, Patrícia, Juliana Inaba e Marcelo Muller, com quem tive uma convivência intensa, divertida e solidária e aos demais não menos especiais Diogo, Ana Claudia, Karen, Stefan, Lys, Helisson e Gracielle. Obrigada a todos por sua amizade e apoio evidenciados nas muitas horas em que batia o cansaço e o desespero...
- Aos carbo-friends, Ana Helena e Lauro, às oxi-friends Gerusa e Tatiana, aos amigos Gustavo e Marcelinho, pela convivência intensa durante o nivelamento, créditos e churrascos e pela sensação de que eu poderia contar vocês sempre.
- Aos amigos do anexo Daniela, Ane, Marco, Michele e Giovani, pela amizade e ajuda constante no laboratório e aos demais Rafael, Marcelo Assunção, Fabiane, Adriana, Cláudio, Luiza, Luciano, Vassoler e Guilherme, por me ajudarem sempre que

eu precisava e pela sua amizade.

- A Lillian e Adriano, à Juliana Ramos e sua “trupe”, companhia perfeita para quem quer esquecer os problemas, valeu pela amizade, pelas festas e pela diversão.

- Aos demais professores e amigos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, em especial à professora Rose Adele, pela sua pronta ajuda sempre que eu precisava e à professora Maria Berenice, pela sua dedicação ao laboratório e correção desse trabalho.

- Ao Prof. Humberto Madeira, por permitir que eu iniciasse os meus estudos de biologia molecular em seu laboratório e por incentivar o meu crescimento profissional e às amigas de laboratório da PUC, Lillian, Poliana e Alessandra por sua amizade sincera.

- A minha família querida, onde estão os meus maiores mestres – pai, mãe, Lipe, Cris e Marcos. Vocês me ensinaram através de seu exemplo as principais virtudes de um pesquisador: humildade, honestidade e dedicação. Estarei sempre em dívida por todo o apoio, amor, carinho e compreensão que deram a mim durante esses dois anos e durante toda a minha vida. Sem vocês seria impossível enfrentar tudo o que eu enfrentei, dentro e fora do laboratório. Obrigada por confiarem em mim, até quando eu mesma duvidava.

- Aos meus avós, tios e primos, por seu amor, carinho e orações constantes.

- Ao meu companheiro Leonardo, pelo seu carinho, amor e apoio em todos os momentos, em especial naqueles momentos difíceis, nos quais você praticamente me carregava nos seus braços. Obrigada a você e a sua família pelo carinho, atenção e apoio.

- A Deus, por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas através dos desafios e alegrias que apareceram durante essa jornada.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	1
1.1.1 CONTRIBUIÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA	2
1.2 DIVERSIDADE ENDOFÍTICA	5
1.2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO	6
1.3 CANA-DE-AÇÚCAR	8
1.4 TAXONOMIA BACTERIANA.....	9
1.5 OBJETIVO GERAL	11
1.5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 ESTIRPES UTILIZADAS	12
2.2 CONDIÇÕES DE RE-ISOLAMENTO	12
2.2.1 FÓRMULA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	13
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	17
2.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA	18
2.4.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS	19
2.5. SEQUENCIAMENTO GENE 16S rDNA	22
2.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	22
2.6.1 ANÁLISE DOS ELETROFEROGRAMAS E MONTAGEM DO CONSENSO...	22
2.6.2 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS POR COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS.....	23
2.7 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS	27
2.7.1 COLORAÇÃO GRAM	27
2.7.2 PERFIL BIOQUÍMICO DOS ISOLADOS	28
2.7.2.1 TESTE DA CITOCROMO C OXIDASE	28
2.7.2.2 CRESCIMENTO EM AGAR MAC CONKEY	28
2.7.2.3 TESTE DA CATALASE	29
2.7.2.4 TESTES PARA ENTEROBACTÉRIAS	29
2.7.2.5 TESTES PARA NÃO ENTEROBACTÉRIAS	29
2.8 ENSAIO DA NITROGENASE	31
3. RESULTADOS	33
3.1 RE-ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO COLMO E DA	33

FOLHA DA CANA-DE-AÇÚCAR	35
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	35
3.2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA	35
3.2.2 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rDNA	37
3.2.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rDNA	37
3.2.3.1 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS POR COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS	38
3.2.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS	42
3.2.4.1 COLORAÇÃO DE GRAM.....	42
3.2.4.2 PERFIL BIOQUÍMICO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS	44
3.2.5 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS BACTÉRIAS NÃO ENTEROBACTÉRIAS	47
3.2.6 FILOGENIA MOLECULAR	49
3.3 ENSAIO DA NITROGENASE	63
4. DISCUSSÃO	64
4.1 BACTÉRIAS ISOLADAS DO COLMO DA CANA-DE-AÇÚCAR	65
4.2 BACTÉRIAS ISOLADAS DA FOLHA CANA-DE-AÇÚCAR	67
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA UTILIZADOS	68
4.4 POTENCIAL DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR	69
5. CONCLUSÕES	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DA REGIÃO Y1-Y2 do gene 16S rDNA DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	21
FIGURA 2. FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	26
FIGURA 3 - PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO Y1-Y2 e REGIÃO Y1-Y3 DO GENE 16S rDNA DE ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	36
FIGURA 4. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS 16S rDNA DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR PERTENCENTES AO GRUPO DAS ENTEROBACTÉRIAS	50
FIGURA 5. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS 16S rDNA DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR PERTENCENTES À FAMÍLIA PSEUDOMONACEAE	52
FIGURA 6 - MATRIZ MOSTRANDO A PROPORÇÃO DE IDENTIDADE ENTRE PARES DE SEQUÊNCIAS DE 16S rDNA DOS ISOLADOS PERTENCENTES À FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE	56
FIGURA 7 - MATRIZ MOSTRANDO A PROPORÇÃO DE IDENTIDADE ENTRE PARES DE SEQUÊNCIAS DE 16S rDNA DOS ISOLADOS DA FAMÍLIA PSEUDOMONACEAE .	57
FIGURA 8 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RECONSTRUÍDA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO Y1-Y2 DO GENE 16S rRNA DOS ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEQUÊNCIAS RELACIONADAS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE	59
FIGURA 9 - DETALHAMENTO FILOGENÉTICO DE ESTIRPES RELACIONADAS AO GÊNERO <i>Enterobacter</i>	60
FIGURA 10 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RECONSTRUÍDA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rDNA DOS ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PERTENCENTES À FAMÍLIA PSEUDOMONACEAE E DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS UTILIZADAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS VEGETAIS.....	4
TABELA 2 SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS	20
TABELA 3 REAÇÕES TESTADAS NO KIT API 20E (BIOMERIÉX) PARA ENTEROBACTÉRIAS	30
TABELA 4 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	34
TABELA 5 PROVÁVEL POSIÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	39
TABELA 6 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE COLMO E CANA-DE-AÇÚCAR.....	41
TABELA 7 COLORAÇÃO DE GRAM DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE COLMO E FOLHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	43
TABELA 8 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENTEROBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS VIA SISTEMA API 20E	45
TABELA 9 TESTES BIOQUÍMICOS PARA AS ESTIRPES NÃO FERMENTADORAS DE GLUCOSE.....	48

RESUMO

Bactérias endofíticas vivem no interior das plantas sem causar sintomas aparentes. As bactérias endofíticas podem beneficiar as plantas. Entretanto, dependendo das condições, como interação entre comunidades bacterianas ou competição por nutrientes, uma bactéria endofítica pode se tornar patogênica. A diversidade de endófitos tem sido avaliada em muitas plantas, mas na cana-de-açúcar os estudos têm focado nas bactérias diazotróficas. No presente estudo, a diversidade bacteriana endofítica de colmo e folha de cana-de-açúcar foi pesquisada utilizando métodos bioquímicos e moleculares. Colmo e folha de cana-de-açúcar foram esterilizados superficialmente com etanol 70% (folhas) ou álcool 70% seguida flambagem (colmo). Extratos foram feitos de cada parte da planta e foram inoculados em placas de agar batata e incubados a 30°C. Quarenta e quatro colônias foram isoladas do colmo e das folhas. O DNA dessas estirpes foi purificado e a porção Y1-Y2 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada. Análises de identidade de sequência foram feitas pelo programa BLASTn, CLUSTALW e análises filogenéticas pelo MEGA3. Para a caracterização fisiológica foram feitas colorações de gram e perfil bioquímico e fisiológico. A maioria das estirpes isoladas de colmo pertence à família Enterobacteriaceae e a maioria dos isolados da folha é da família Pseudomonaceae, sugerindo que alguns grupos de bactérias ocupem nichos preferenciais. Os isolados foram divididos em cinco grupos, sendo os dois maiores pertencentes à sub-divisão gama-proteobacteria. O grupo I, pertencente à família Enterobacteriaceae e o grupo II, à família Pseudomonaceae. Entre os isolados da família Enterobacteriaceae, a maioria foi identificada como *Enterobacter* spp, ocorrendo também representantes dos gêneros *Pantoea* spp., *Khuyvera* sp., *Klebsiella* sp, e um provável *Citrobacter* sp. Os isolados pertencentes à família Pseudomonaceae foram identificados como *Pseudomonas* spp. Um único isolado de colmo da cana-de-açúcar foi identificado como *Brevibacillus* sp, e outros dois como *Staphylococcus* spp. Dois representantes do gênero *Curtobacterium* spp. foram isolados, um do colmo e outro da folha da cana-de-açúcar. Em relação à capacidade de fixação de nitrogênio, foram encontrados dois isolados do gênero *Enterobacter* e um do gênero *Pseudomonas* capazes de reduzir acetileno a etileno. Esses resultados sugerem que a diversidade endofítica da cana-de-açúcar seja maior do que aquela descrita anteriormente. Os organismos identificados nesse trabalho têm potencial para promoção de crescimento, controle biológico e fixação de nitrogênio.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BACTERIAS ENDOFÍTICAS

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos na Terra e podem compreender mais um milhão de espécies (KENNEDY, A.C. 1999). Apesar dessa grande diversidade estima-se que tenhamos conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes (TORSVIK et al., 2002). Elas estão presentes em todos os ambientes terrestres e, através de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas de todo o ambiente a sua volta (NEWMAN & BANFIELD, 2002) ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, desde o sistema digestório de animais superiores e materiais mortos até fontes termais submarinas, incluindo as superfícies e interior de plantas, água doce e salgada, interior de rochas e geleiras.

Em particular, as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano. Nestas plantas hospedeiras, diferentes nichos são ocupados pelos microrganismos, tais como as superfícies das raízes e folhas (as epífitas), ou então, estas colonizando o interior de diversos tecidos das plantas. As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em dois grupos, com base na sua relação com o hospedeiro.

O primeiro grupo é o das bactérias endofíticas que são geralmente definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN et al., 1997). Esse conceito as diferencia do outro grupo de bactérias que, apesar de também viver no interior da planta podem causar doença, trazendo prejuízo ao seu hospedeiro. Este segundo grupo é composto pelas bactérias patogênicas. Essa diferenciação não é definitiva, uma vez que a relação benéfica ou patogênica depende de fatores como as condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações bacterianas. Sendo assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições, se tornar um patógeno. Ou ainda, uma epífita pode entrar na planta,

tornando-se endofítica ou patogênica (ANDREWS & HARRIS, 2000; SABARATNAM & BEATTIE, 2003; KLOEPPER et al., 1992).

No presente estudo, assim como KLOEPPER e colaboradores (1992) fizeram, serão consideradas endofíticas todas as bactérias que colonizam tecidos do interior das plantas, tanto as que trazem benefícios às plantas quanto aquelas que, eventualmente, causem doenças.

Os microrganismos endofíticos entram na planta, primeiramente através da raiz, entretanto, partes aéreas das plantas, como as flores, caules e cotilédones podem também ser usados. Dentro da planta essas bactérias podem se localizar no ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (HALLMANN et al. 1997; ZINNIEL et al., 2002). Bactérias endofíticas parecem penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN et al., 1997).

O modo de dispersão das bactérias endofíticas pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou insetos (BALDANI, 1997).

1.1.1 CONTRIBUIÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA

Inicialmente os microrganismos endofíticos eram considerados inócuos às plantas, porém a partir da década de 70 começou-se a verificar a sua importância para as plantas (AZEVEDO, 2002).

Há vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas, como a promoção do crescimento vegetal, controle biológico de pragas e doenças nas plantas, fixação biológica de nitrogênio (DOWNING et al., 2000; VERMA et al., 2001; DÖBEREINER & BODDEY, 1981), indução de resistência sistêmica (HALLMANN, 1997), produção de sideróforos (BURD et al., 1998; WENBO MA et al., 2000) e produção de antibióticos (STROBEL & DAISY, 2003).

A promoção do crescimento vegetal se dá principalmente pela produção de fitoormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno pelas bactérias endofíticas. A produção desses fitormônios já foi relatada em bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (LEE et al. 2004; ZAKRAHOVA, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL, 2004). O ácido indol acético é uma auxina importante de ocorrência natural que provoca possui efeitos fisiológicos na planta, como aumento do crescimento apical (LAMBRECHT et al., 2000).

O controle biológico de pragas e doenças consiste em utilizar microrganismos que ajam como antagonistas aos agentes causadores das doenças (AZEVEDO, 2000). Isso pode ser feito através da competição de nutrientes, produção de substâncias nocivas aos patógenos, ou indução de resistência sistêmica. Esse controle em espécies cultivadas vem ao encontro a uma necessidade de reduzir o consumo de agroquímicos nas culturas (ARAÚJO et al., 2002).

Os fungos foram os primeiros microrganismos explorados para o controle biológico (SAHAY e VARMA, 1999; AZEVEDO et al., 2000). Porém, muitas bactérias vêm sendo estudadas. A espécie bacteriana mais usada como antagonista a patógenos é *Bacillus subtilis* (BACON et al., 2000). Além dessa, bactérias da família *Pseudomonaceae* e do gênero *Nostoc* também vêm sendo usadas no controle biológico (RAJKUMAR et al., 2005; BERGSMAN-VLAMI et al., 2005; BIONDI, 2004).

Serafini e colaboradores reuniram num quadro as principais bactérias endofíticas utilizadas no controle de doenças provocadas por bactérias patogênicas ou por fungos (SERAFINI et al., 2002) (Tabela 1).

TABELA 1 – BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS UTILIZADAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS VEGETAIS

Cultura	Patógenos	Endófito
Acer sp	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Bacillus spp</i>
Algodão	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Algodão	<i>R. solani</i> , <i>Phytophthora ultimum</i>	<i>B. subtilis</i>
Algodão e feijão	<i>R. solani</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Algodão e milho	<i>Fusarium moliniforme</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Arroz	<i>R. solani</i>	<i>P. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
Banana	<i>F. oxysporum f. sp. cubense</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Batata	<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	<i>Bacillus alcalophilus fsp. Halodurans</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , <i>C. luteum</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pseudomonas tolaasii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia plymuthica</i>
Batata	<i>V. dahliae</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
Carvalho	<i>Ceratocystis fagacearum</i>	<i>Pseudomonas denitrificans</i> , <i>P. putida</i>
Castanha	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>B. subtilis</i>
Cravo e rabanete	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. fluorescens</i>
Feijão	<i>S. rolfsii</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. subtilis</i>
Pepino	<i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Erwinia racheiphila</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Lacrymans</i>	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>flaccumfaciens</i>
Pepino	<i>F. oxysporum f. Sp. Cucumerium</i> , <i>C. orbiculare</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Lacrymans</i>	<i>P. fluorescens</i>
Pêra	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. pumilus</i>
Pêra	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
Pocan	<i>Phoma tracheiphila</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i>
Repolho	<i>Xantomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	<i>Alcaligenes piechaudii</i> , <i>Kluyvera ascorbata</i>
Tomate	<i>F. oxysporum</i> , <i>V. dahliae</i>	<i>B. pumilus</i> , <i>P. fluorescens</i>
Trevo e batata	<i>R. solani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Arthrobacter ilicis</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Cellulomonas turbata</i> , <i>Curtobacterium citreum</i> , <i>C. flaccumfaciens</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>X. campestris</i> , <i>Tanthonomas oryzae</i>
Uva e framboesa	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> , <i>P. Fluorescens</i> .

FONTE: Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Luciana Atti Serafini, Neiva Monteiro de Barros, João Lúcio Azevedo. EDUCS, p. 247, 2002.

1.1.2 DIVERSIDADE DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares (MYERS, 1996).

Apesar de sua importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (PACE, 1997). Este fato se deve em parte aos métodos de isolamento e identificação usados. Até recentemente, para identificação de uma espécie bacteriana era necessário obter uma cultura pura e, nesta identificação utilizavam-se características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A maior limitação deste procedimento é o fato de que a grande maioria de bactérias não pode ser obtida como cultura pura. Mesmo a diversidade de organismos cultivável não é bem avaliada, já que um grande número de meios de cultura e técnicas de cultura devem ser utilizados para avaliar a diversidade de um determinado nicho.

Atualmente um maior número de organismos tem sido identificado e tantos outros reclassificados pelo uso de técnicas de identificação e classificação molecular, muitas delas permitindo a identificação de organismos não cultiváveis (KIRCHOFF et al., 1996; UEDA et al., 1995). A data do primeiro estudo em diversidade de bactérias endofíticas é controversa. Entretanto é notável que a partir dos anos 80 e 90 esses estudos ganharam grande importância. Em 1984 BECKING isolou endofíticos de nódulos de raízes de plantas da família Rosaceae e identificou as características morfológicas de *Frankia* spp. através de micrografia eletrônica de transmissão (BECKING, 1984).

Em colmo, folhas e nódulos de trevo vermelho, STURZ e colaboradores (1997) mostraram colonização pelos endofíticos *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter*

agglomerans, *Rhizobium* spp, *Agrobacterium* spp, *Curtobacterium* spp, *Bacillus* spp, *Bordetella* spp, *E. coli*, *Pasteurella* spp, *Pseudomonas* spp, e *Xanthomonas* (STURZ et al., 1997).

Em raízes de canola e trigo foi encontrada uma alta proporção dos endofíticos *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Rathayibacter* (GERMIDA et al., 1998; MISKO & GERMIDA, 2002).

Nos últimos anos os estudos de diversidade endofítica bacteriana de uma extensa variedade de plantas têm sido realizados utilizando principalmente técnicas de tipagem molecular. Recentemente MOCALI e colaboradores (2003) pesquisaram a diversidade endofítica em *Ulmus* spp. utilizando as técnicas de sequenciamento do gene rRNA 16S e ARDRA, encontrando representantes dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* e *Stahlylococcus*.

Em três variedades diferentes de batata foram encontrados representantes das subdivisões alfa, beta e gama-proteobactéria (BERG et al., 2004; SESSITCH et al., 2002). Técnicas de tipagem molecular permitiram a descrição de endofíticos em soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), de plantas cítricas (ARAUJO et al., 2002), arroz (VERMA et al., 2001; CHAINTREUL et al., 2000) e trigo (CONN & FRANCO, 2004) Em cana-de-açúcar e outras gramíneas, estudos de diversidade de endofíticos estão bastante direcionados aos organismos fixadores de nitrogênio (CABARELLO-MELLADO E MARTINEZ-ROMERO, 1994; OLIVARES, 1996, ELBELGATYU, 2001).

1.1.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Um grupo de bactérias endofíticas presentes em diferentes espécies vegetais é composto pelas bactérias diazotróficas, capazes de fixar nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

O nitrogênio é um elemento químico fundamental na formação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Porém, a maior parte do nitrogênio está na forma gasosa (N_2), inerte para animais e vegetais. Na natureza, a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita, principalmente, pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas (YOUNG, 1992).

A reação de incorporação do nitrogênio pelas bactérias diazotróficas é catalisada pelo complexo da enzima nitrogenase e consiste na conversão do nitrogênio gasoso (N_2) na sua forma mais reduzida, como íons amônio $(NH_4)^+$, que serão utilizados pelos seres vivos para a formação de seus compostos nitrogenados (POSTGATE, 1982).

As bactérias diazotróficas ocupam nichos distintos, podendo ser de vida livre, associativos e simbióticos. A Fixação Biológica de Nitrogênio foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas da rizosfera e do rizoplane de uma grande variedade de plantas não-leguminosas (DÖBEREINER, 1992). Porém evidências recentes mostram que algumas bactérias diazotróficas colonizam o interior da planta e são conhecidas como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (OLIVARES et al., 1996; REINHOLD-HUREK et al., 2000; URETA et al., 1995). Gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras foram identificadas com hospedeiros de diversas espécies de bactérias endofíticas diazotróficas, sendo as principais *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp (JAMES & OLIVARES, 1997; TRIPLETT, 1996; BALDANI et al., 1997; JAMES 2000; BODDEY et al. 2003).

Diversos estudos mostram que estes endofíticos colonizam seus hospedeiros em grande número e causam um aumento de produção (que tipo, qual). Na cultura do arroz inundado, por exemplo, há uma contribuição da fixação de nitrogênio de 30 a 60 Kg N/ha /ano (SANTIAGO et al., 1986). Na cana-de-açúcar a contribuição pode chegar a 150 kg N/ha/ano (URQUIAGA et al., 1992). A possibilidade de se substituir o nitrogênio fertilizado com a fixação biológica de nitrogênio deve ser considerada, pois

esta é econômica e ambientalmente vantajosa (REIS et al, 2000).

Da cana-de-açúcar foram isoladas várias bactérias diazotróficas endofíticas como *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp* e mais recentemente um isolado relacionado à *Pantoea* sp (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE E DOBEREINER, 1988; NUNEZ & COLMER, 1968; DONG et al., 1994; LOIRET, 2004). Uma outra diazotrófica endofítica, o *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, foi descrito na cana-de-açúcar como agente causador na estria mosqueada (OLIVARES et al., 1997).

1.3 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar pertence à família das gramíneas, uma das maiores famílias da classe das angiospermas (JOLY, 1993), e é uma das culturas mais importantes do Brasil, o maior produtor mundial. A produção brasileira de açúcar em 2002 foi de mais de 364 milhões de toneladas. O Paraná é o estado segundo maior produtor brasileiro, atrás de São Paulo e Alagoas e está em expansão (http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2002/Artigos/rev58_produto.htm).

Além da produção de açúcar, álcool e aguardente, os subprodutos da cana (bagaço, vinhaça e tona de filtro) são de grande importância socioeconômica na geração de energia, ração animal, aglomerados, fertilizantes etc.

Devido à grande importância dessa cultura, fatores que aumentem a sua produção ou diminuam o custo de produção são importantes. Dentre esses fatores estão o controle ou erradicação de microrganismos que possam provocar doenças à planta, podendo esses microrganismos ser vírus, fungos ou bactérias.

1.4 TAXONOMIA BACTERIANA

Taxonomia é a ciência da classificação dos organismos, ou seja, a ciência de ordená-los em grupos com base em suas características comuns (BUSSE et al., 1996). A taxonomia de vegetais e animais superiores se dá basicamente pela observação de características fenotípicas, facilmente observáveis a olho nu ou com a ajuda de ferramentas simples como lupa ou microscópio ótico. Esse tipo de abordagem nem sempre se aplica a microrganismos como bactérias, pois o seu tamanho e simplicidade impedem uma classificação baseada em tais parâmetros. A alternativa usada é a observação de reações fisiológicas características de determinados grupos de bactérias que possam vir a ajudar nessa classificação.

Testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos são usados na taxonomia de bactérias desde a década de 20 (BUSSE et al., 1996). Esses métodos testam, entre outras coisas, a capacidade de utilização de diferentes fontes de carboidrato e a presença de determinadas enzimas.

Até pouco tempo atrás a identificação bacteriana baseava-se somente nessas características. Isso gerava um problema, pois organismos não relacionados filogeneticamente podem apresentar características semelhantes se ocupassem o mesmo ambiente.

Em 1996, KIRCHOFF admitiu que a identificação de novos isolados é difícil se for baseada em critérios puramente fenotípicos e fisiológicos e, principalmente, se as características mostradas por um isolado em particular não são completamente idênticas às espécies já descritas (KIRCHOFF, 1996).

Por esse motivo tem se recomendado uma abordagem polifásica para a identificação de bactérias. Isso inclui informação fenotípica, genotípica e filogenética (VANDAMME, 1996).

Um dos desafios da sistemática tem sido estabelecer uma classificação que reflita a filogenia dos organismos. Nesse contexto, surge a possibilidade de se usar

marcadores moleculares que reflitam a sua origem evolutiva e auxiliem na sua classificação.

Para ser usada como marcador molecular, a molécula deve ter as seguintes características: deve ser universalmente distribuída no grupo a ser estudado; deve ser funcionalmente homóloga em cada organismo; o alinhamento das seqüências das moléculas deve ser perfeitamente possível para poder identificar regiões conservadas e não-conservadas; a seqüência da molécula deve mudar num índice mensurável (BROCK, 1997). O marco principal do uso de marcadores moleculares foi quando WOESE e colaboradores em 1987 descreveram o uso do gene rRNA 16S na filogenia de bactérias (WOESE et al., 1987). As seqüências de rRNA contendo domínios altamente conservados, intercalados com regiões variáveis (HEAD et al., 1998). A comparação de seqüência de rRNA é uma ferramenta importante para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos (WEISBURG et al., 1999).

O ribossomo bacteriano é composto do RNA ribossomal e várias proteínas. Ele é constituído de duas subunidades principais, a 40 S (denominada subunidade maior) e a 30 S, (subunidade menor). Na subunidade maior estão as moléculas de rRNA 23 S, a de 5S e mais 31 proteínas; na subunidade menor estão o rRNA 16S e mais 21 proteínas (WOODSON & LEONTIS, 1998).

O gene 16S rDNA é um gene universal e tem função conservada, que permite construir um esboço da árvore evolutiva de bactérias. Essa análise re-afirma certas categorias baseadas nas relações fenotípicas e fisiológicas, mas desmantela outras, colocando os organismos em novos grupos (YOUNG, 1992).

A similaridade entre seqüências indica uma origem comum de genes correspondentes (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994). Esse fato possibilita a o uso de seqüências de DNA ou RNA na identificação bacteriana.

Árvores filogenéticas baseadas em seqüências de rRNA mostram que a diversidade é representada por grupos naturais relacionados, as divisões filogenéticas (WOESE, 1987).

1.5 OBJETIVO GERAL

Determinar a diversidade de bactérias endofíticas isoladas de colmo e folhas de cana-de-açúcar.

1.5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o posicionamento taxonômico dos isolados endofíticos da cana-de-açúcar com base na identidade de sequência da porção parcial do gene 16S rDNA e nos perfis bioquímicos.
- b) Pesquisar as identidades das seqüências da porção do gene 16S rDNA dos isolados endofíticos de cana-de-açúcar com seqüências homólogas de bancos de dados públicos.
- c) Determinar o perfil bioquímico e fisiológico dos isolados endofíticos
- d) Construir árvores filogenéticas utilizando as seqüências parciais do gene 16S rDNA dos isolados e de organismos conhecidos depositados nos bancos de dados

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESTIRPES UTILIZADAS

As estirpes utilizadas nesse trabalho foram isoladas pela Dra. Claudia Martin Didonet em 2001 no Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR de partes de cana-de-açúcar e estão listadas na tabela 4. As plantas foram coletadas e as bactérias isoladas de diferentes tecidos (folha, colmo e raiz). Para o isolamento de bactérias endofíticas de folha, estas foram primeiramente picadas e submetidas à esterilização da sua superfície através da imersão em solução de álcool 70%. O colmo foi esterilizado por imersão em álcool 70%, posteriormente flambado em chama e, em seguida, descascado assepticamente. Folhas e colmos foram triturados separadamente em Tris-HCl 10mM pH 8,0 estéril em diferentes diluições (de 10^{-1} a 10^{-7}). As suspensões foram semeadas em placas de agar batata ou meio DYGS. Um novo cultivo em meio líquido foi feito e usado para estocar os isolados em solução de glicerol a 50% a -20° C. A partir desses estoques as colônias foram re-isoladas para uso nesse trabalho. Estas bactérias foram consideradas endofíticas de cana-de-açúcar embora não foi comprovado posteriormente a colonização endofítica.

2.2 CONDIÇÕES DE RE-ISOLAMENTO

Para o re-isolamento foram inoculados 50 μ L da solução de estoque em glicerol em frascos de 10 mL contendo 3 mL do meio no qual a bactéria foi inicialmente isolada (DYGS ou meio batata). Os frascos foram agitados a 120 rpm e 30° C durante a noite (~ 16 h). As culturas de bactérias obtidas foram re-inoculadas no

mesmo meio líquido sob as mesmas condições. No dia seguinte as culturas foram semeadas em meio sólido, utilizando a técnica de esgotamento com alça de platina. Colônias individuais de todas as estirpes foram selecionadas para estudo e estocadas em glicerol a 50% a -20° C. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24-48 h. Colônias isoladas foram coletadas, crescidas novamente em meio líquido e estocadas em glicerol 50% a - 20° C. As bactérias que eventualmente não cresceram nos meios DYGS ou batata foram inoculadas novamente a partir da solução estoque nos meios NFbHPN-lactato, NFbHPN-malato, JMV ou LB, e as culturas obtidas processadas como descrito acima.

2.2.1 FÓRMULA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

MEIO BATATA (EMBRAPA, 1999)

Quantidade para 1 L final de meio

Batata	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL

SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
H_3BO_3	1,4 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,175 g

SOLUÇÃO DE VITAMINAS

Biotina	10 mg
---------	-------

Piridoxol-HCl	20 mg
---------------	-------

MEIO JMV (BALDANI, 1996)

Quantidades para 1 litro de meio de cultura:

Manitol	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2 g
Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2,0 mL
Solução de micronutrientes (ver abaixo)	2,0 mL
Fe EDTA solução 1,64%	4,0 mL
Solução de vitaminas (ver abaixo)	1,0 mL

O pH foi ajustado para 4,2 - 4,5. Como fonte de nitrogênio foram adicionados 10 mmol/ L de glutamato de sódio.

MEIO NFbHPN (MACHADO et al., 1991)

Quantidades para 1 litro de meio de cultura:

Ácido málico ou lactato	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Solução de micronutrientes (ver abaixo)	2,0 mL

Azul de bromotimol (solução 0,5% em KOH 0,2 N)	2,0 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4,0 mL
Solução de vitaminas (ver abaixo)	1,0 mL
KOH	4,5 g

O pH foi ajustado para 6,5 – 6,8 com KOH. Fonte de nitrogênio: NH_4Cl 20 mmol/L

SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES PARA MEIO DE CULTURA JMV e NFHbPN (DÖBEREINER et al., 1995)

Quantidades suficientes para 200 mL de solução:

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,235 g
H_3BO_3	0,28 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,008 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,024 g

SOLUÇÃO DE VITAMINAS PARA MEIO DE CULTURA JMV e NFBHPN (DÖBEREINER et al., 1995)

Quantidades suficiente para 100 mL de solução:

Biotina	10 mg
Piridoxal - HCl	20 mg
Dissolvidos em banho-maria.	

MEIO DYGS (RODRIGUEZ NETO, 1986)

Quantidade suficiente para um litro

Glucose	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
K_2HPO_4	0,5 g

Mg ₂ SO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada	1.000 ml

O pH foi ajustado para 6,0

MEIO LB (SAMBROOK et al., 1989)

Quantidade suficiente para um litro

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada	1.000 mL

O pH foi ajustado para pH 7,0 com NaOH

MEIO NFDM (CANNON et al., 1976)

Quantidade suficiente para um litro

MgSO ₄ 10%	1 mL
Na ₂ NO ₃ , 2H ₂ O 0,1%	25 mL
FeSO ₄ .7 H ₂ O 0,2%	12,5 mL
Glucose	20 g
H ₂ O destilada	950 mL

O pH foi ajustado para 5,0

FOSFATO PARA NFDM

K ₂ P0 ₄	241,2 g
KH ₂ PO ₄	68 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavar e usar 50 mL por litro de meio.

Para obter os respectivos meios sólidos foram adicionados 15 g de ágar

bacteriológico para cada litro de meio líquido. Os meios foram esterilizados por autoclavagem a 1,5 atm, 121°C por 20 minutos.

MAC CONKEY (MILLER, 1992)

Quantidade suficiente para um litro

Peptona	17 g
Polipeptona	3 g
Lactose	10 g
Sais biliares	1,5 g
Cloreto de sódio	5 g
Agar	135 g
Vermelho neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,01 g

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As estirpes bacterianas foram cultivadas no meio líquido no qual elas foram isoladas. Alíquotas (1,5 mL) da cultura foram centrifugados a 13.000 x g por 60 segundos e as células ressuspendidas em 700 µL de tampão GET (50mmol/L de glucose, 25mmol/L de Tris HCl pH 8,0 e 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). A seguir, adicionou-se lisozima numa concentração final de 300 µg/mL e incubou-se a 37°C por 60 minutos. Em seguida 150 µL de solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37°C por mais meia hora. Pronase E e RNase foram adicionadas, para uma concentração final de 200 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, incubou-se a 37°C durante a noite (~16h). No dia seguinte, adicionou-se 500 µL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (1:1) aos tubos

com as amostras, seguido de agitação branda por aproximadamente 10 minutos. A emulsão foi então centrifugada a 13000 x g por 10 minutos. A solução sobrenadante foi retirada e transferida para um novo tubo plástico de 1,5 mL. Esse processo foi repetido mais duas vezes. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 2 volumes de etanol e incubação em geladeira durante a noite. Na manhã seguinte a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 13.000 x g e o sobrenadante descartado. O DNA que estava no tubo foi então lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70% e recuperado por centrifugação por 5 minutos a 13.000 x g. Depois da segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco a vácuo para retirada do etanol residual. Finalmente, o DNA foi dissolvido em 100-200 µL de água milli-Q estéril, mantido à temperatura ambiente por 24h e estocado a 4°C. O DNA foi submetido a uma eletroforese em um gel de ágar a 1% (60 V por aproximadamente 1 h) em tampão TBE (89 mmol/L Trisbase, 89 mmol/L Tris ácido bórico, EDTA 2mmol/L pH 8,0).

2.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RDNA

Para a amplificação do gene 16S rDNA foi utilizado a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou a reação em cadeia da polimerase) utilizando-se um termociclador *Eppendorf Master Cycle*. Para uma reação de PCR com volume final de 25 µL, utilizou-se 0,7 µL do DNA (50 a 100 ng) como molde; 2,5 µL de tampão de reação da Taq DNA polimerase 10X (concentração final; Tris-HCl 20 mmol/L, KCl 50 mmol/L); 1,5 mmol/L MgCl₂; 0,2 mmol/L dNTP; 4 pmol/L do oligonucleotídeo *forward*; 4 pmol/L do oligonucleotídeo reverso e 0,8 U da Taq DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada com os seguintes ciclos de temperaturas: 1) 94°C/ 60 s (1X), 2) 94°C/ 30 s, 57°C/ 20 s, 72°C/ 1 min (35 X), 3) 72°C/ 5 min. Para confirmação da amplificação, 2,5 µL da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de ágar a 1% em tampão TBE. A eletroforese foi desenvolvida 50V por aproximadamente 2 horas. Para a purificação dos fragmentos de DNA obtidos,

adicionou-se 15 µL acetato de amônio 7,5 mol/L e 40 µL de etanol 100% (1 volume). Os tubos foram incubados no gelo por 20 minutos e centrifugados por 15 minutos a 13.000 x g. O DNA foi lavado com etanol 70% duas vezes, seco a vácuo e dissolvido em 20 µL de água milli-Q estéril.

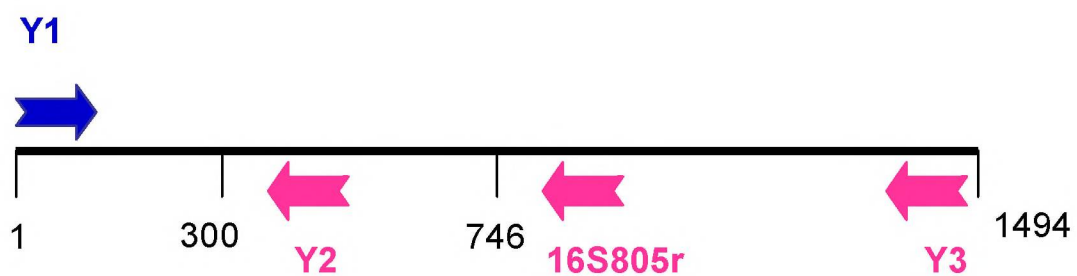
2.4.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS

Nas reações de amplificação do gene 16S rDNA foram usados 3 conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores diferentes: Y1-Y2, Y1-Y3 e Y1-16S805R (Figura 1). O Y1 anela na ponta 5' do gene 16S rDNA e o Y3 na 3', gerando um produto de amplificação que compreende quase todo o gene, de aproximadamente 1,5 Kb. O conjunto Y1-Y2 permite a amplificação de aproximadamente 350 pb a partir da ponta 5' da molécula do 16S rDNA. O par Y1-16S805R foi usado quando reação com os outros oligonucleotídeos iniciadores falhou e resultou num produto de aproximadamente 750pb.

TABELA 2. SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

Nome	Tamanho (pb)	Posição 16S rDNA em <i>E. coli</i>	Sequência (5'→3')	Referência
Y1f	24	20-43	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	YOUNG et al. 1991
Y2r	24	338-361	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	YOUNG et al. 1991
Y3r	26	1482-1507	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	CRUZ, 2001
16S805r	23	783-805	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	CRUZ, 2001

FIGURA 1. ESQUEMA DE ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS NA REGIÃO Y1-Y2 DO GENE 16S rDNA



2.5 SEQÜENCIAMENTO GENE 16S RDNA

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado entre 0,5 e 1,0 µL (50-200 ng) do produto de amplificação purificado; 2 µL de reativo ET (Dye Terminator Kit-Amersham Biosciences); 5 pmol de primer (Y1 ou Y2) e água milli-Q estéril até um volume de 5 µL. O programa usado no termociclador *Eppendorf Master Cycle* foi o seguinte: 95°C / 20 s, 55°C/ 15 s, 60°C/2 min (35 X). Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados adicionando-se 5 µL de água milli-Q estéril; 1 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 30 µL etanol 95%. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 13.000 x g, descartado o sobrenadante e o produto lavado com etanol 70% duas vezes. O excesso de etanol era retirado no dessecador a vácuo e as amostras foram mantidas a -20°C até análise no seqüenciador automático ABI 377.

2.6 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

As análises serão feitas conforme o fluxograma da figura 2.

2.6.1 ANÁLISE DOS ELETROFORETROGRAMAS E MONTAGEM DO CONSENSO

A análise no seqüenciador automático ABI377 gerou arquivos contendo o eletroforetrograma de cada seqüência.

Estes eletroforetrogramas eram inicialmente analisados com o auxílio do programa PHRED (EWING et al., 1998) que fez a chamada de bases (*basecalling*) e gerou um arquivo contendo a seqüência de bases. Além disso, este programa calculou um valor de qualidade para cada uma das bases. O valor de qualidade atribuído a cada base pelo programa PHRED (*q*) é obtido por:

$$q = -10 \times \log_{10}(p),$$

onde p é a probabilidade de erro estimada para uma determinada chamada de base. Sendo assim, uma base com a probabilidade de 1/1000 de estar incorreta terá um valor de qualidade PHRED igual a 30. Os arquivos contendo a sequência de bases e seus respectivos valores de qualidade são gerados pelo programa PHRED (contendo a extensão “.phd”).

Levando em consideração a sequência de bases e os valores de qualidades calculados pelo PHRED, o programa PHRAP (EWING et al., 1998) gera uma sequência consenso, com base na sobreposição de sequências. As sequências alinhadas e o consenso foram visualizados e analisados no editor de sequências CONSED (GORDON et al., 1998). Alternativamente, as sequências consenso foram obtidas a partir do programa CAP3 (Contig Assembly Program - HUANG, 1992) que, assim como o PHRAP, utiliza a sequência de bases e as qualidades determinadas pelo PHRED. Nas etapas seguintes, as análises foram efetuadas com as sequências consenso obtidas como descrito anteriormente. No próximo passo as sequências foram visualmente analisadas através do programa BioEdit (HALL, 2004). As regiões contendo regiões dos oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y2 foram identificadas e as regiões correspondendo à sequência do oligonucleotídeo Y1 e toda a região a montante foram retiradas. Da mesma forma, as regiões correspondendo à sequência do oligonucleotídeo Y2 e toda a região a jusante foram retiradas.

2.6.2 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS POR COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS

As sequências consensos, sem os oligonucleotídeos iniciadores, foram analisadas pelo programa *Seqmatch* - disponível no *site* RDP (Ribosomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu>). Esse programa classifica taxonomicamente as sequências com opções de classificação de acordo com a taxonomia bacteriana

proposta no Bergey's Trust ou como classificadas pelo NCBI. Para a taxonomia de acordo com o Bergey's, um grupo de seqüências bem caracterizadas é fornecida pelo Bergey's Trust. Outras seqüências são adicionadas no esquema usando o "RDP Naive Bayesian Classifier". Este algoritmo é "treinado" com seqüências para 16S rDNA de estirpes tipo. A freqüência de todos os sessenta e quatro mil fragmentos de seqüências com oito bases possíveis ("palavras") é calculada para o grupo de seqüências de treinamento em cada um dos cerca de 880 gêneros. Uma seqüência qualquer pode ser então taxonomicamente classificada calculando-se a probabilidade de ocorrência de suas "palavras" em comparação àquelas em cada um dos gêneros no grupo de treinamento, usando a estatística "naive Bayesian".

Em seguida foi feita uma busca de similaridade no banco de dados do GenBank através do programa BLASTn (ALTSCHUL, 1997) . Esse programa está disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov). Nessa etapa foi determinada a identidade das seqüências dos isolados com seqüências já caracterizadas existentes no banco de dados. A procura por identidade é feita através alinhamentos locais entre as regiões da seqüência desconhecida (a que se deseja pesquisar) e seqüências do banco de dados. Como resultado, obtém-se a lista de seqüências com o nome do gene e o organismo a qual ela pertence, de maior identidade. A qualidade do alinhamento é dada pelo valor *score*, e um *valor E*, que indica a probabilidade daquele alinhamento ter sido ao acaso e não devido a uma relação entre as seqüências. A qualidade do alinhamento é dada pelo valor *score*, em bits (quantidade de informação). Este valor representa o valor do *score* para o alinhamento, denominado S' e calculado a partir de um segundo valor de *score* para o alinhamento, denominado S (ou *score* bruto). O valor de S' é calculado pela seguinte fórmula:

$$- S' = (\lambda S - \ln.K) / \ln 2$$

Os parâmetros λ e K dependem da matriz de substituição escolhida e das penalizações para os *gaps* (descontos nos valores de *score*). Essa matriz definirá os valores dados

aos diferentes tipos de substituição. O valor do *score* bruto (S) é calculado diretamente a partir do alinhamento, como sendo a soma dos valores de substituição (obtidos a partir das matrizes de substituição) menos a soma para os *gaps*.

Depois de analisados todas as seqüências consenso, um alinhamento global foi realizado com todas as seqüências dos isolados junto com as seqüências que apresentaram maior grau de identidade identificado pelo programa BLASTn. Esse alinhamento foi feito pelo programa CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) e foi usado na etapa seguinte para a construção das árvores filogenéticas pelo programa MEGA3 (KUMAR et al., 2004). Nessa análise a distância evolutiva foi calculada para cada par de seqüências do alinhamento através do método JUKES & CANTOR (SAITOU e NEI, 1987). Esse método constrói uma matriz numérica, onde cada valor representa a estimativa da distância entre cada par de seqüências. Para que não haja uma sub-estimativa da distância evolutiva real que separa os organismos, o programa aplica um modelo evolutivo específico, com correção para ocorrência de substituições múltiplas. A partir da matriz de distância, a topologia da árvore filogenética foi reconstruída através do método de *Neighbor-Joining*. Este método parte de uma topologia sem resolução (estrela) e procura, em cada ciclo, o par de seqüências que contribui com a menor soma de ramos para a topologia da árvore (Método de Evolução Mínima).

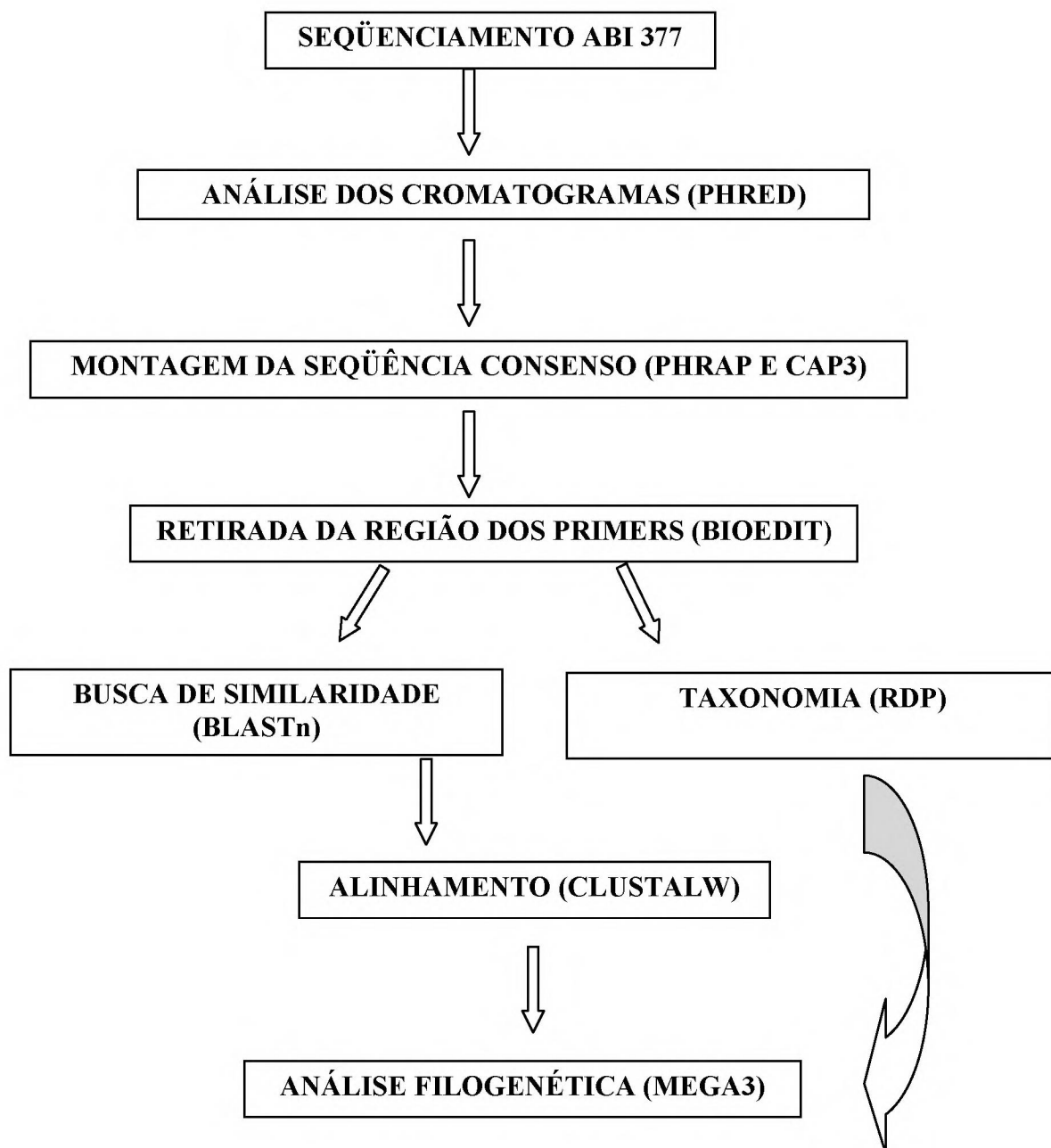


FIGURA 2. FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

2.7 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS

2.7.1 COLORAÇÃO GRAM

A coloração de gram baseia-se na capacidade que certas bactérias possuem em reter a coloração de cristal violeta após descoloração com álcool. Estas são denominadas gram positivas. As bactérias que perdem a coloração após o tratamento com álcool são denominadas gram-negativas e são contrastadas com um corante de cor diferente.

Uma única colônia isolada em placa foi retirada com o auxílio de um palito e espalhada numa lâmina de vidro. Em seguida foi adicionada solução cristal de violeta sobre a lâmina por um minuto, e enxaguado com água. Em seguida a lâmina foi tratada com iodo por mais um minuto. A descoloração foi realizada com acetona, e enxaguado com água e, por último, tratado com fucsina por 30 s.

2.7.2 PERFIL BIOQUÍMICO DOS ISOLADOS

A fim de iniciar a caracterização do perfil bioquímico dos isolados, foi investigada a presença da enzima citocromo c oxidase através do teste da oxidase.

2.7.2.1 TESTE DA CITOCROMO C OXIDASE

No teste da citocromo c oxidase uma colônia isolada foi esfregada com o auxílio de uma alça de platina em uma tira previamente umedecida com soro fisiológico esterilizado. As tiras vêm impregnadas com solução contendo 125 mg de N N dimetil para fenileno diamina e 125 mg de alfa naftol em 25 mL de álcool etílico e 25 mL de água deionizada. As bactérias que possuem atividade da citocromo c oxidase (oxidase positiva) provocam uma oxidação rápida do reativo, o qual é originalmente incolor e torna-se púrpura intenso quando oxidado.

2.7.2.2 CRESCIMENTO EM AGAR MAC CONKEY

Numa etapa posterior, as estirpes foram semeadas em placas agar Mac Conkey, seletivo para enterobacteriaceae.

A ocorrência de crescimento nesse meio é um indicativo de que o isolado poderia ser uma enterobactéria. Nesse caso a estirpe era submetida a um conjunto de testes específicos para esse grupo de bactérias, que nesse caso foi o kit API-20E bioMérieux (seção 2.7.2.3).

As bactérias que não apresentavam crescimento no agar Mac Conkey eram testadas separadamente em outras reações (seção 2.7.2.5).

2.7.2.3 TESTE DA CATALASE

Além dessas bactérias que eram testadas conforme o crescimento ou não no meio Mac Conkey houve um grupo de bactérias para o qual o teste gram deu positivo. Esse grupo foi caracterizado bioquimicamente através do teste da catalase.

O teste da catalase consiste em adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a uma colônia isolada sobre uma lâmina de vidro. O teste positivo evidencia-se pela formação de bolhas.

2.7.2.4 TESTES PARA ENTEROBACTÉRIAS

O kit API-20E (bioMérieux) consiste de uma tira com vinte microtúbulos, que permite a avaliação de vinte características fenotípicas e bioquímicas (Tabela 2). A inoculação dos isolados nesse kit foi feita conforme as recomendações do fabricante e após 24 horas de incubação as tiras eram lidas e os resultados foram computados e analisados com o auxílio do programa APILAB.

TABELA 3 – REAÇÕES TESTADAS NO KIT API 20E (bioMérieux) PARA ENTEROBACTÉRIAS

TESTES	COMPONENTE ATIVO	Característica bioquímica
ONPG	2-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	β-galactosidase
ADH	L-arginina	Arginina dihidrolase
LDC	L-lisina	Lisina descarboxilase
ODC	L-ornitina	Ornitina descarboxilase
CIT	Citrato de sódio	Utilização do citrato
H ₂ S	Tiosulfato de sódio	Produção de H ₂ S
URE	Uréia	Uréase
TDA	L-triptofano	Triptofano Desaminase
IND	L-triptofano	Produção de Indol
VP	Piruvato de Sódio	Produção de acetoína
GEL	Gelatina	Gelatinase
GLU	D-glucose	Fermentação Glucose
MAN	D-manitol	Fermentação
INO	Inositol	Fermentação Inositol
SOR	D-sorbitol	Fermentação Sorbitol
RHA	L-ramnose	Fermentação Ramnose
SAC	D-sacarose	Fermentação Sacarose
MEL	D-melibiose	Fermentação Melibiose
AMY	Amigdalina	Fermentação Amigdalina
ARA	L-arabinose	Fermentação Arabinose
OX	Citocromo c	Citocromo-oxidase

ONPG: orto-nitro-fenil-β-galactopiranosídeo (atividade da β-galactosidase), ADH: atividade da arginina dehidrolase, LDC: atividade da lisina descarboxilase, ODC: atividade da ornitina descarboxilase, CIT: utilização de citrato, H₂S: atividade da urease, TDA: atividade de triptofano deaminase, IND: produção de indol, VP: produção de acetoína, GEL: atividade de gelatinase, GLU: fermentação da glicose, MAN: fermentação do manitol, INO: fermentação do inositol, SOR: fermentação sorbitol, RHA: fermentação rhamnose, SAC: fermentação sacarose, MEL: fermentação melibiose, AMY: fermentação da amigdalina, ARA: fermentação da arabinose, OX: atividade da citocromo oxidase.

2.7.2.5 TESTES PARA NÃO ENTEROBACTÉRIAS

As bactérias que não apresentaram crescimento no agar Mac Conkey ou que o apresentavam mas não fermentavam a glucose no kit api20E (BioMeriex) foram classificadas com base nas seguintes características: crescimento ou não em agar Mac Conkey, teste da citocromo c oxidase e oxidação e fermentação de glucose. Essa última reação consistia em incubar a bactéria em um tubo contendo glucose e vedado com óleo mineral. O não crescimento nesse tubo indicava que a bactéria seria uma não-fermentadora da glucose.

2.8 ENSAIO DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno.

As estirpes de bacterianas foram cultivadas inicialmente em LB e alíquotas (100 µL) dessa cultura foram inoculados em 4 mL de meio NFDM líquido com 0,5 mM de glutamato de sódio como fonte de nitrogênio. Os frascos com culturas em meio líquido foram vedados com rolhas de borracha (*subba-seal*) e incubados no shaker a 30°C por 16 horas sob agitação de 120 rpm e, então injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco). A cultura foi incubada nas mesmas condições por mais 1 hora. Após este período foi coletada uma amostra de 0,5mL para análise do etileno formado por cromatografia gasosa. Foi utilizado cromatógrafo Varian 244D equipado com uma coluna de Porapak N e detetor de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do dectetor em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio super seco. Para quantificar o etileno formado foi utilizado uma amostra padrão de etileno em N₂ 100 ppm (White Martins S.A.). Cada alíquota de 0,5mL deste padrão contém 2,16 nmol de etileno a 1 atmosfera e a 25°C. Se as

bactérias que não apresentaram atividade da nitrogenase nesse período, tirava-se o subba-seal (no fluxo) para saída do acetileno injetado, injetava-se mais 0,5 mM de acetileno e incubava-se novamente por mais 24 horas a 30°C. No dia seguinte e a fase gasosa era re-analisada.

3 RESULTADOS

3.1 RE-ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO COLMO E DA FOLHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

As estirpes bacterianas isoladas pela Dra. Claudia Didonet estocadas em glicerol foram crescidas em meio Batata ou DYGS (meios de isolamento) líquido e posteriormente em placas de Petri. Grande parte dessas estirpes apresentou um bom crescimento (em ~24h) no meio no qual elas foram originalmente isoladas (DYGS ou meio batata). As estirpes que não cresceram até 72 h após o inóculo, foram inoculadas em meios alternativos como LB, NFbHPN-malato, NFPbHPN-lactato e JMV (TABELA 4). O crescimento no agar Mac Conkey foi testado e utilizado como critério preliminar para caracterização fisiológica (como explicado no item 2.7.2). As estirpes foram estocadas em solução de glicerol a 50%, em freezer a -20°C .

Do total das estirpes analisadas, 22 foram isoladas de colmo, designadas CC e 22 de folha de cana-de-açúcar, designadas FC.

Dezesseis estirpes isoladas do colmo da cana-de-açúcar foram analisadas bioquímica e molecularmente, 3 estirpes tiveram apenas o seu perfil bioquímico definido e outras 3 foram analisadas somente com base na sequência parcial do gene 16S rDNA.

Quinze estirpes isoladas de folha de cana-de-açúcar foram analisadas bioquímica e molecularmente, 2 tiveram somente o perfil bioquímico determinado e 5 apenas do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. As estirpes do colmo e da folha que foram analisadas bioquímica e molecularmente estão marcados com um asterisco (*) na tabela 4.

TABELA 4 - CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

<i>ISOLADO</i>	<i>NFbHPN-malato</i>	<i>NFbHPN-lactato</i>	<i>JMV</i>	<i>DYGS</i>	<i>MAC Conkey</i>	<i>LB</i>	<i>MEIO BATATA</i>
CC 12*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 13	+	+	+	+	+	ND	+
CC 14*	+	+	+	+	+	+	+
CC 16*	+	+	+	+	+	+	+
CC 18	ND	ND	ND	+	-	ND	-
CC 20*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 21*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 22*	+	+	+	+	+	+	+
CC23	ND	ND	ND	+	-	ND	+
CC 26*	+	+	+	+	+	+	+
CC 27*	+	+	+	+	-	+	+
CC 29*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 32	+	+	+	+	+	ND	+
CC 33*	+	+	+	+	+	+	+
CC 35	+	ND	+	ND	+	-	+
CC 36	+	ND	+	ND	+	-	+
CC 37*	+	+	+	+	+	+	-
CC 38*	ND	ND	ND	ND	+	+	-
CC 43*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 46*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 47*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 48*	+	+	+	ND	+	+	+
CC 49	+	ND	ND	+	+	ND	+
FC 2*	+	+	ND	+	+	+	+
FC 5*	ND	+	ND	+	-	-	+
FC 6*	ND	+	+	+	-	+	+
FC 9*	+	+	+	+	-	-	+
FC 10	ND	+	ND	+	-	ND	ND
FC 12*	ND	ND	ND	+	-	+	+
FC 15	ND	+	ND	+	-	ND	ND
FC 16*	ND	+	ND	+	-	+	+
FC 18*	ND	+	ND	+	ND	+	ND
FC 19*	ND	+	ND	+	+	+	-
FC 21	ND	+	+	+	-	+	+
FC 22*	ND	+	ND	+	-	+	-
FC 23*	ND	+	ND	+	-	+	+
FC 24*	+	+	+	+	+	+	+
FC 26	ND	+	+	ND	+	ND	ND
FC 28*	ND	ND	ND	ND	-	+	+
FC 29*	ND	+	ND	+	-	+	+
FC 35	ND	+	ND	+	+	+	-
FC 36	ND	+	ND	+	+	+	-
FC 38	ND	+	ND	+	+	+	+
FC 39	ND	+	ND	+	+	+	+
FC 40*	ND	+	ND	+	-	-	+

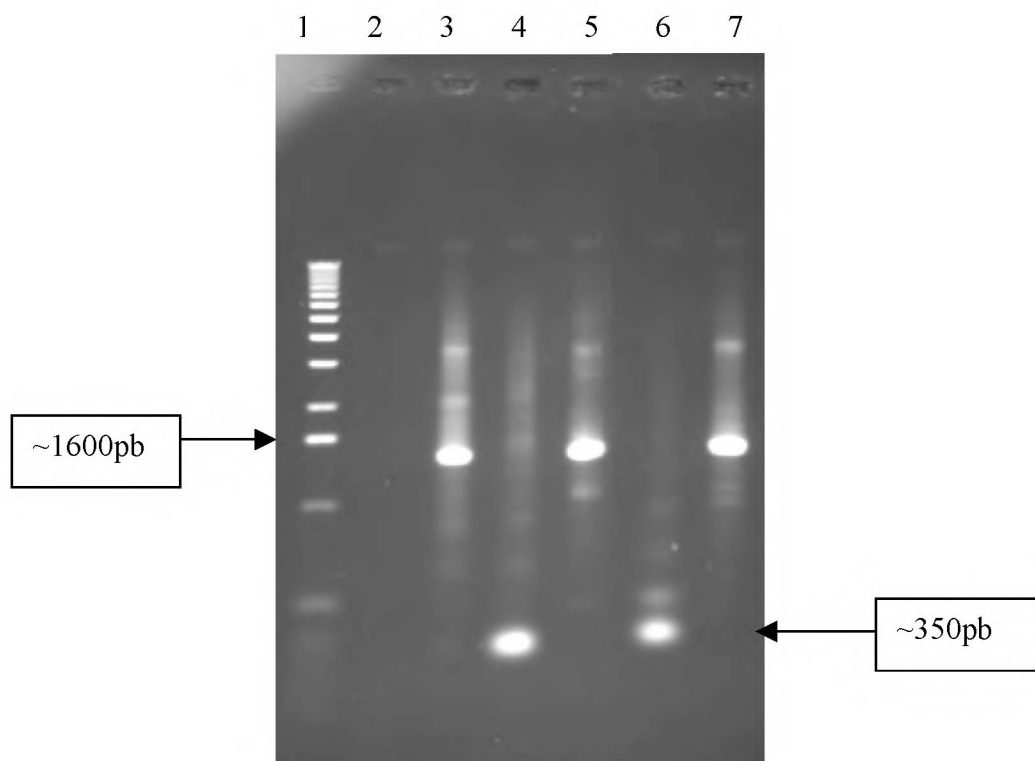
(+): crescimento no meio. (-): ausência de crescimento. (ND): condição não testada. As estirpes com (*) tiveram dados de sequenciamento de DNA e bioquímicos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

3.2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA

O DNA total dos 44 isolados bacterianos foi purificado e utilizado como molde na reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) para amplificação de seus genes 16S rRNA. Essa reação foi realizada com os pares de oligonucleotídeos Y1-Y2, Y1-16S805r ou Y1-Y3 (ver figura 2, seção 2.4.1). O produto da reação de amplificação com os oligonucleotídeos Y1-Y3 (correspondente ao intervalo entre os nucleotídeos 20 a 1.507 do gene *rrsB* de *E. coli*) corresponde ao gene 16S rDNA quase completo, e gerou um fragmento único de aproximadamente 1.500 pb. Entretanto, não foi possível amplificar o 16S rDNA de todas as estirpes com este par de oligonucleotídeos. Para estes casos, optou-se por usar o par de oligonucleotídeos Y1-Y2. Este par de oligonucleotídeos amplifica cerca de 350 pb na ponta 5' do gene 16S rRNA (correspondente ao intervalo entre os nucleotídeos 20 a 361 do gene *rrsB* de *E. coli*). Esta é uma região variável do gene e, conseqüentemente, útil na análise filogenética das bactérias. Alternativamente, o par de oligonucleotídeos Y1 e 16S805r também foi utilizado na amplificação dos isolados. Neste caso uma banda de cerca de 750 pb foi obtida na amplificação. Os produtos de amplificação para cada um dos pares de oligonucleotídeos usados são apresentados na figura 3.

FIGURA 3 - PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO Y1-Y2 e REGIÃO Y1-Y3 DO GENE 16S rDNA DE ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.



ELETROFORESE EM GEL DE AGAR 1% (50V POR 2 HORAS).

1. 1 KB LADDER (INVITROGEN)
2. controle sem DNA
- 3, 5 e 7. produto de PCR com os oligonucleotídeos Y1-Y3
- 4 e 6. produto de PCR com os oligonucleotídeos Y1-Y2.

3.2.2 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rDNA

As seqüências das duas fitas da região Y1-Y2 de 44 isolados da cana-de-açúcar foram obtidas a partir dos produtos de PCR purificados (sem clonagem). Os oligonucleotídeos usados na reação de seqüenciamento foram os mesmos usados na amplificação do fragmento (Y1 e Y2). Um arquivo contendo a seqüência e o eletroforetograma foi gerado para cada leitura (*read*) no seqüenciador automático ABI 377.

3.2.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rDNA

Os eletroforetogramas foram analisados primeiramente pelo programa PHRED, que atribui valor de qualidade às bases. As seqüências obtidas para os oligonucleotídeos Y1 e Y2 foram usadas para a montagem das seqüências consenso pelo programa PHRAP e CAP3 para cada estirpe separadamente. Regiões de baixa qualidade foram identificadas e retiradas das análises posteriores. Para os isolados FC24, FC29, FC35, FC38, FC40 e o FC9, a má qualidade das bases na região próxima ao oligonucleotídeo Y1, não permitiu que as seqüências consensos das estirpes contivessem a região Y1-Y2 completa, resultando em seqüências menores. O comprimento final das seqüências consenso para cada uma das estirpes está mostrado na tabela 6.

3.2.3.1 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS POR COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS

As sequências consenso de cada isolado foram analisadas utilizando o programa *Seqmatch* que usa o banco de dados RDP (Ribosomal Data Project - www.rdp.cme.edu). Essa análise resultou na distribuição das sequências em cinco grupos (TABELA 5). Nessa análise todas as sequências dos isolados foram analisadas em conjunto e classificadas em cinco grupos de acordo com a identidade de sequência.

Os isolados dos grupos I e II foram agrupados na sub-divisão das gama-Proteobactérias, dentro da divisão Proteobacteria. O grupo I está junto à ordem Pseudomonales, família Pseudomonaceae e compreende os isolados FC5, FC6, FC9, FC10, FC12, FC15, FC16, FC18, FC19, FC22, FC23, FC25, FC28, FC29, FC35, FC38, FC40, CC12 e CC35. O grupo II, relacionado à ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae compreende os isolados CC14, CC16, CC20, CC21, CC22, CC26, CC29, CC33, CC37, CC43, CC46, CC47, CC48 e FC2.

Já o grupo III, constituído unicamente pelo isolado CC38, foi posto junto à divisão Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família Paenibacillaceae, gênero *Brevibacillus*. E o grupo IV no qual os isolados CC18 E CC23 foram arranjados, pertence à família Staphylococcaceae, gênero *Staphylococcus*.

E, finalmente o grupo V, composto pelos isolados FC24 e CC27, agrupado com a divisão Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Microbacteriaceae.

TABELA 5 - PROVÁVEL POSIÇÃO TAXONÔMICA DE BACTERIAS ISOLADAS DA CANA-DE- AÇÚCAR

Domínio Bactéria		
Divisão Proteobacteria		
Sub-divisão Gama-proteobactéria		
Grupo I	Ordem Pseudomonales	
	Família Pseudomonaceae	
	Gênero <i>Pseudomonas</i>	
	FC5 FC6 FC9 FC10 FC12 FC15 FC16 FC18 FC19 FC22	FC23 FC25 FC28 FC29 FC35 FC38 FC40 CC12 CC35
Grupo II	Ordem Enterobacteriales	
	Família Enterobacteriaceae	
	CC14 CC16 CC20 CC21 CC22 CC26 CC29 CC33	CC37 CC43 CC46 CC47 (gênero <i>Pantoea</i>) CC48 FC2
Divisão Firmicutes		
Classe Bacilli		
Grupo III	Ordem Bacillales	
	Família Paenibacillaceae	
	Gênero <i>Brevibacillus</i>	
	CC 38	
Grupo IV	Família Staphylococcaceae	
	Gênero <i>Staphylococcus</i>	
	CC18	
	CC23	
Divisão Actinobacteria		
Classe Actinobacteria		
Grupo V	Ordem Actinomicetales	
	Família Microbacteriaceae	
	FC24 CC27	

As seqüências parciais dos genes 16S rDNA de estirpes endofíticas isoladas de cana-de-açúcar foram analisadas utilizando o programa *Seqmatc* (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

As seqüências consenso também foram comparadas com seqüências do banco de dados público GenBank através do programa BLASTn (NCBI-www.ncbi.nih.gov). Os resultados dessa comparação estão na tabela 4. Essa análise apresentou valores de escore variando entre 515 e 666. O isolado CC47 apresentou o menor valor (468) e os isolados FC15, FC18, FC21 e FC26 apresentaram valores escores acima de 900.

Os resultados obtidos reproduziram os níveis hierárquicos da análise anterior onde a maioria das seqüências foi reunida em dois principais grupos, um junto à família Enterobacteriaceae e outro com a família Pseudomonaceae. Nessa análise, o isolado CC38 foi classificado como um *Brevibacillus* spp., e o FC24 e o CC27 como *Curtobacterium* spp. da família Microbacteriaceae. Os resultados dos isolados CC18 e CC23 foram também condizentes com a análise anterior sendo classificados como do gênero *Staphylococcus*.

TABELA 6- IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM BASE NA IDENTIDADE DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rDNA 

Isolado	Organismo mais relacionado	Score	Valor E	Identidade	Tamanho do fragmento	Acesso no Genbank
CC 12	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	515	e-143	97%	288 pb	AY158041.1
CC 14	<i>Citrobacter freundii</i>	551	e-154	96%	294 pb	AY163805.1
CC 16	<i>Enterobacter pyrinus</i>	579	e-162	99%	294 pb	AY579161.1
CC 18	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	597	e-168	99%	305 pb	AJ717376
CC 20	<i>Kluyvera sp</i>	563	e-158	99%	288 pb	AY117578.1
CC 21	<i>Kluyvera sp</i>	581	e-163	100%	294 pb	AY117578.1
CC 22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	571	e-166	99%	292 pb	AF352384.1
CC 26	<i>Enterobacter intermedius</i>	575	e-161	100%	291 pb	AF297470.1
CC 27	<i>Curtobacterium sp</i>	652	0.0	100%	290 pb	AY688358.1
CC 29	<i>Kluyvera sp</i>	583	e-184	100%	294 pb	AY117578.1
CC 33	<i>Enterobacter pyrinus</i>	579	e-162	99%	294 pb	AY579161.1
CC 35	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	515	e-141	97%	291 pb	AY158041.1
CC 37	<i>Pantoea sp</i>	533	e-147	97%	294 pb	AF394539.1
CC 38	<i>Brevibacillus brevis</i>	615	e-173	98%	274 pb	AY591911.1
CC 43	<i>Enterobacter pyrinus</i>	581	e-163	100%	294 pb	AY579161.1
CC 46	<i>Pantoea sp</i>	523	e-146	97%	294 pb	AF394539.1
CC 47	<i>Pantoea ananatis</i>	468	e-129	99%	249 pb	AJ629190.1
CC 48	<i>Kluyvera sp</i>	575	e-161	99%	294 pb	AY117578.1
FC 2	<i>Enterobacter sp</i>	636	e-160	99%	292 pb	AY689046.1
FC 5	<i>Pseudomonas sp</i>	547	e-153	99%	284 pb	AY787208.1
FC 6	<i>Pseudomonas sp</i>	541	e-155	98%	284 pb	AY043558
FC 9	<i>Pseudomonas sp</i>	521	e-145	98%	282 pb	AY043558.1
FC 10	<i>Pseudomonas sp</i>	571	e-160	100%	288 pb	AY366185
FC 12	<i>Pseudomonas sp</i>	666	e-160	100%	288 pb	AY366185.1
FC 15	<i>Pseudomonas sp</i>	1000	0.0	96%	288 pb	AY787208
FC 16	<i>Pseudomonas sp</i>	547	e-153	98%	288 pb	AY043558.1
FC 18	<i>Pseudomonas grimontii</i>	1164	0.0	100%	282 pb	AY366185.1
FC 19	<i>Pseudomonas sp</i>	577	e-149	98%	288 pb	AY043558.1
FC 21	<i>Pseudomonas grimontii</i>	1019	0.0	99%	259 pb	AF268029
FC 22	<i>Pseudomonas sp</i>	555	e-155	100%	288 pb	AY366185.1
FC 23	<i>Pseudomonas sp</i>	531	e-148	98%	288 pb	AY787208.1
FC 24	<i>Curtobacterium sp</i>	615	e-173	100%	287 pb	AY688357.1
FC 26	<i>Pseudomonas grimontii</i>	940	0.0	98%	282 pb	AF268029
FC 28	<i>Pseudomonas sp</i>	571	e-160	100%	288 pb	AY366185.1
FC 29	<i>Pseudomonas sp</i>	521	e-145	98%	282 pb	AY043558.1
FC 35	<i>Pseudomonas sp</i>	585	e-155	99%	283 pb	AY787208
FC 38	<i>Pseudomonas sp</i>	624	e-150	98%	288 pb	AY787208.1
FC 40	<i>Pseudomonas sp</i>	638	e-145	98%	282 pb	AY043558

Análise baseada na identidade de seqüências da região Y1-Y2 do gene 16S rDNA com seqüências do banco de dados do Genbank. O programa utilizado foi o BLASTn.

Organismo mais relacionado: organismo que possui a seqüência com a qual a seqüência parcial do gene 16S rDNA do isolado de cana-de-açúcar apresentou maior homologia.

Score: pontuação do alinhamento.

Valor E: probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas seqüências.

Identidade: porcentagem de identidade entre a seqüência do isolado de cana e o organismo relacionado.

Tamanho do fragmento: tamanho da seqüência consenso.

Acesso no GenBank: número de acesso da seqüência do organismo relacionado.

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

Os isolados endofíticos foram também caracterizados quanto ao padrão bioquímico e coloração de gram.

3.2.4.1 COLORAÇÃO DE GRAM

O padrão de coloração de gram para todos os isolados foi determinado e está mostrado na tabela 7. A maioria dos isolados é bacilo gram negativo, com exceção dos isolados CC18, CC23, CC27, CC38 e FC24 que apresentaram resultado positivo na coloração de gram.

Os resultados da coloração de gram são consistentes com as análises feitas por similaridade de seqüências.

TABELA 7 - COLORAÇÃO DE GRAM DAS ESTIRPES ENDOFÍTICAS ISOLADAS ENDOFÍTICOS DE COLMO E FOLHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.

ISOLADO	CLASSIFICAÇÃO DE GRAM	ISOLADO	CLASSIFICAÇÃO DE GRAM
CC 12	BGN	CC 35	BGN
CC 18	CGP	FC 2	BGN
CC 14	BGN	FC 5	BGN
CC 29	BGN	FC 6	BGN
CC 33	BGN	FC 9	BGN
CC 34	BGN	FC 12	BGN
CC 38	BGP	FC 16	BGN
CC 47	BGN	FC 18	BGN
CC 37	BGN	FC 19	BGN
CC 43	BGN	FC 21	BGN
CC 27	BGP	FC 22	BGN
CC 46	BGN	FC 23	BGN
CC 48	BGN	FC 24	BGP
CC 35	BGN	FC 25	BGN
CC 16	BGN	FC 28	BGN
CC 20	BGN	FC 29	BGN
CC 21	BGN	FC 35	BGN
CC 22	BGN	FC 38	BGN
CC 26	BGN	FC 40	BGN
CC 23	CGP		

BGN: bacilo gram negativo

BGP: bacilo gram positivo

CGP: coco gram negativo

3.2.4.2 PERFIL BIOQUÍMICO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

A determinação do perfil bioquímico e fisiológico dos isolados foi feita após análise preliminar nas seqüências. Essa análise preliminar consistiu em pesquisa de homologia de seqüência através do programa BLASTn. Os resultados preliminares mostraram que parte das seqüências era similar a seqüências do gene 16S rDNA de representantes da família das enterobactérias. Por esse motivo decidiu-se usar um sistema identificação de enterobactérias para avaliar parte dos isolados.

O meio agar Mac Conkey foi usado por ser um meio de pré-seleção para a determinação de perfil bioquímico. Dos 44 isolados testados, 22 cresceram nesse meio e foram testados com o Kit API-20E (BioMérieux). Os resultados de todas as reações estão na tabela 8.

A maioria dos isolados (CC13, CC14, CC22, CC29, CC33, CC 36, CC37, CC43, CC49 e FC2) foi identificada como pertencente ao gênero *Enterobacter*. As estirpes CC16, CC21 e CC47 foram identificadas como *Pantoea* spp. O isolado bacteriano CC20 tem o perfil similar ao de *Kluyvera* spp. Os isolado CC32 não apresentou um perfil que permitisse a sua identificação (perfil não conclusivo).

Alguns isolados apresentaram um perfil ambíguo, ou seja, o conjunto de reações se mostrou similar a dois organismos diferentes. O perfil bioquímico apresentado pelo isolado CC48 foi compatível com *Citrobacter freundii* e com *Pantoea* spp. CC21 também ficou com o perfil entre dois gêneros, *Citrobacter freundii* ou *Pantoea*.

Os isolados FC18 e FC26 foram inoculados no kit e apesar de não serem enterobactérias foram identificados. Os perfis desses isolados são compatíveis com *Pseudomonas* spp.

TABELA 8 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ENTEROBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS VIA SISTEMA API 20E
continua

<i>Isolado</i>	<i>CC13</i>	<i>CC14</i>	<i>CC16</i>	<i>CC20</i>	<i>CC21</i>	<i>CC22</i>	<i>CC29</i>	<i>CC26</i>	<i>CC32</i>	<i>CC36</i>	<i>CC33</i>
ONPG	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ADH	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
LDC	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
ODC	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
VP	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
SOR	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
RHA	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Identificação	<i>Enterobacter cloacae</i> (92%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (96,6%)	<i>Pantoea sp</i> (60%)	<i>Kluyvera spp</i>	<i>Pantoea sp</i> (50%) Cit. Freundi(48%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (97,6%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (91%)	<i>Enterobacter spp</i>	Perfil não conclusivo	<i>Enterobacter cloacae</i> (98,8%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (97,9%)

termina

<i>Isolado</i>	<i>CC37</i>	<i>CC43</i>	<i>CC46</i>	<i>CC47</i>	<i>CC48</i>	<i>CC49</i>	<i>FC2</i>	<i>FC18</i>	<i>FC26</i>	<i>FC36</i>	<i>FC39</i>
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ADH	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ODC	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IND	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
INO	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
SOR	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
RHA	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identificação	<i>Enterobacter cloacae</i> (85%)	<i>E. cloacae</i> (91,5%)	<i>E. cloacae</i> (90,9%)	<i>Pantoea sp</i> (75,3%)	<i>C freundii</i> (90%)/ <i>Enterobacter</i> (10%)	<i>Enterobacter sp</i> (99%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (100%)	<i>Pseu-domonas spp</i>	<i>Pseu-domonas spp</i>	<i>Pantoea sp</i> (81,1%)	<i>Pantoea Sp</i> (99,4%)

Os campos com o sinal (+) indicam reação positiva e os campos com sinal (-) indicam reação negativa, e os campos em branco indicam condição não-testada. ONPG: orto-nitro-fenil-β-galactopiranosídeo (atividade da β-galactosidase), ADH: atividade da arginina dehidrolase, LDC: atividade da lisina descarboxilase, ODC: atividade da ornitina descarboxilase, CIT: utilização de citrato, H₂S: atividade da urease, TDA: atividade de triptofano deaminase, IND: produção de indol, VP: produção de acetoina, GEL: atividade de gelatinase, GLU: fermentação da glicose, MAN: fermentação do manitol, INO: fermentação do inositol, SOR: fermentação sorbitol, RHA: fermentação rhamnose, SAC: fermentação sacarose, MEL: fermentação melibiose, AMY: fermentação da amigdalina, ARA: fermentação da arabinose, OX: atividade da citocromo oxidase. Os isolados FC18, FC 26, CC 16, CC20 e CC 26 não tiveram o seu perfil identificados ao nível de espécie com o kit Api-20E.

3.2.5 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS BACTÉRIAS NÃO ENTEROBACTÉRIAS

As bactérias que não cresceram no meio agar Mac Conkey, ou que cresceram mas não fermentaram a glucose no Kit API-20E foram testadas de outra maneira. Primeiramente, para confirmar a condição de não-fermentadoras da glucose, elas foram inoculadas em tubos com glucose em ambiente anaeróbico e aeróbico. A seguir, foi feito o teste da citocromo c oxidase, que é um teste que auxilia na classificação desses isolados.

Com base nesses quatro testes e considerando o resultado da coloração gram, os isolados foram classificados em BGN (bacilos gram negativo) não-fermentadores da glucose e oxidase negativa. Sendo que os isolados CC35 e FC19 oxidam glucose e são capazes de crescer no meio Mac Conkey; já o FC9 e o FC23 oxidam glicose e não crescem no meio Mac Conkey; finalmente os isolados FC5, FC6, FC12, FC16, FC22, FC 28, FC29 e FC40 não oxidam glucose e nem crescem em Mac Conkey.

Os isolados CC38, CC27 e FC24 foram testados separadamente em virtude de serem bacilos gram positivos. Todos apresentaram resultado positivo no teste da catalase.

TABELA 9 - TESTES BIOQUÍMICOS PARA AS ESTIRPES NÃO FERMENTADORAS DE GLUCOSE.

<i>Isolado/Teste bioquímico</i>	<i>AERÓBICO (1 GLUCOSE)</i>	<i>ANAERÓBICO (2 GLUCOSE)</i>	<i>CRESCIM MAC CONKEY</i>	<i>TESTE DA OXIDASE</i>
CC12	IN	IN	+	-
CC35	OXI	IN	+	-
FC5	IN	IN	-	-
FC 6	IN	IN	-	-
FC 9	OXI	IN	-	-
FC 12	IN	IN	-	-
FC 16	IN	IN	-	-
FC 19	OXI	IN	+	-
FC 22	IN	IN	-	-
FC 23	OXI	IN	-	-
FC 28	IN	IN	-	-
FC 29	IN	IN	-	-
FC 40	IN	IN	-	-

1 OF GLUCOSE: tubo contendo glucose e após inoculação a tampa do frasco é deixada frouxa

2 OF GLUCOSE : tubo com glucose vedado com óleo após inoculo para criar ambiente anaeróbico

AGAR MAC CONKEY: meio de crescimento para enterobactérias

TESTE DA OXIDASE: avalia a presença da enzima citocromo c oxidase

IN: não oxidou glucose

OXI: oxidou glucose

(+): crescimento em Mac Conkey

(-): não crescimento am Agar Mac Conkey/teste da oxidase negativo

3.2.6 FILOGENIA MOLECULAR

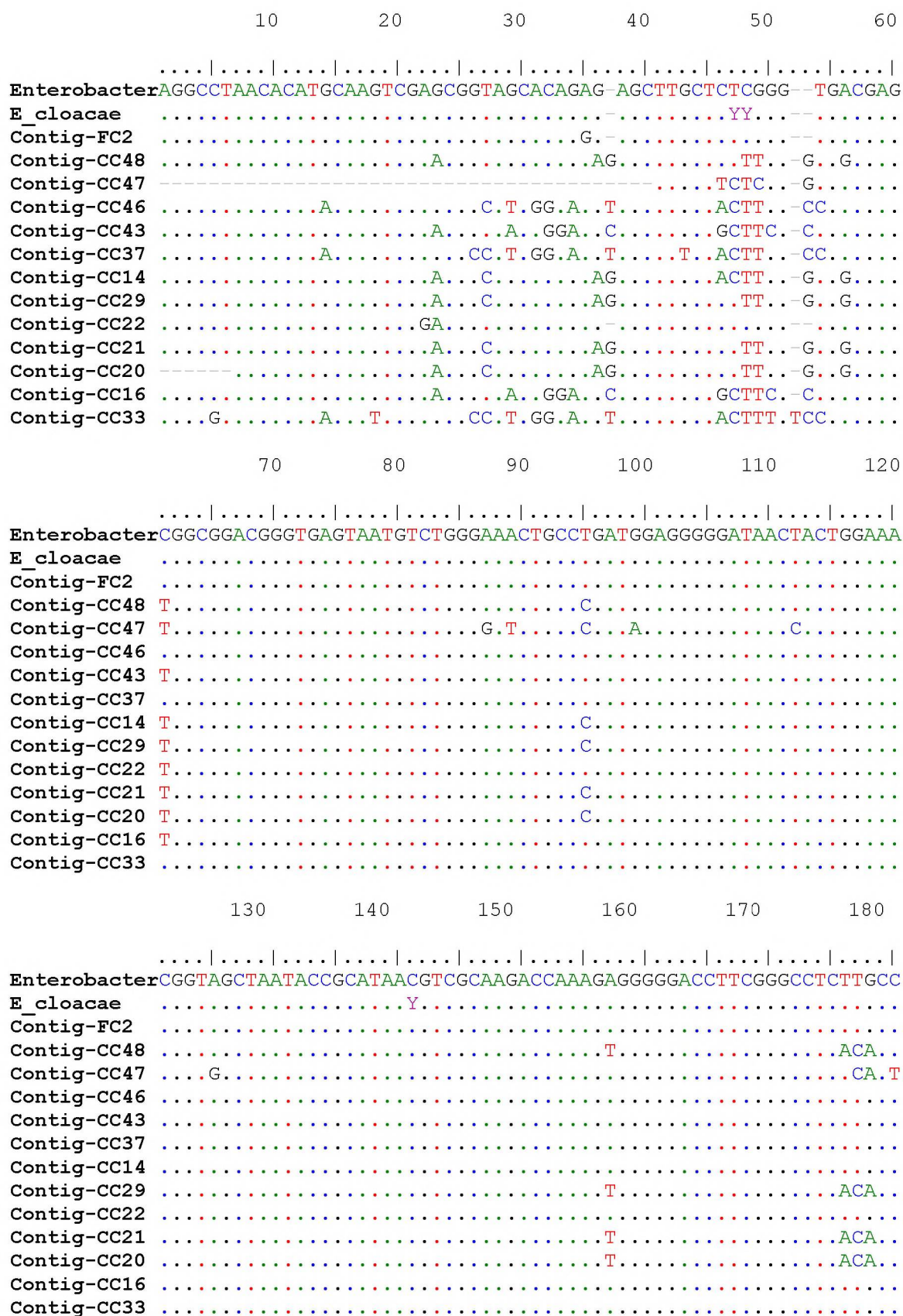
Ao nível molecular, a similaridade de sequência indica uma origem comum de genes, ou seja, as sequências similares podem ser relacionadas filogeneticamente. As análises filogenéticas foram realizadas a fim de ajudar na correta identificação das estirpes e determinar seu relacionamento com espécies afins. Essas análises foram feitas a partir das sequências da região Y1-Y2 do 16S rDNA dos isolados.

As análises utilizando o programa BLASTn e *Seqmatch* mostraram que havia grupos distintos de bactérias. Os dois grupos maiores, um relacionado com as enterobactérias e outro com a família *Pseudomonaceae*, foram alinhados separadamente. Esses alinhamentos foram feitos com as estirpes isoladas da cana-de-açúcar e com sequências selecionadas do banco de dados GenBank que apresentaram maior pontuação (score) na busca a partir das sequências dos próprios isolados (ANEXO).

Os alinhamentos (figura 4 e figura 5) foram feitos somente com as sequências das estirpes isoladas da cana-de-açúcar e algumas estirpes do banco de dados. Esses alinhamentos foram realizados para visualizar melhor o nível de parentesco entre as estirpes isoladas da cana-de-açúcar. O primeiro foi feito com as sequências das estirpes classificadas como enterobactérias e duas sequências do gênero *Enterobacter* obtidas no banco de dados GenBank (figura 4). As sequências dos isolados da família *Pseudomonaceae* foram alinhadas com as de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* (figura 5).

Todos os alinhamentos foram produzidos pelo programa CLUSTAW, utilizando o método com algoritmo rápido que, apesar de não ser tão preciso, é rápido e produziu alinhamentos consistentes em função do alto grau de semelhança entre as sequências.

FIGURA 4. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA PORÇÃO Y1-Y2 DO GENE 16S rDNA DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR PERTENCENTES AO GRUPO DAS ENTEROBACTÉRIAS

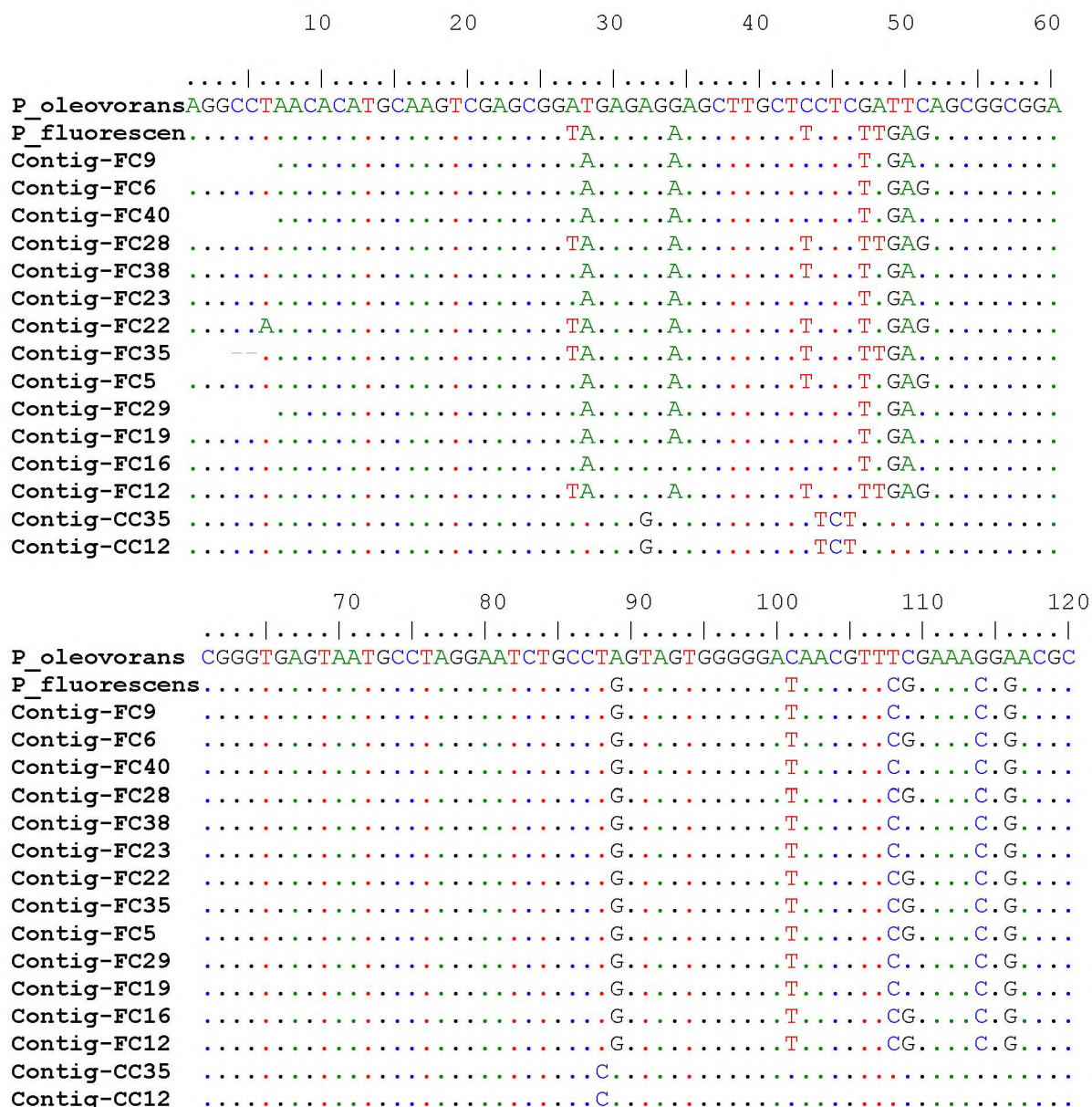


	190	200	210	220	230	240
Enterobacter	ATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGA					
E_cloacae
Contig-FC2
Contig-CC48	.	G.	.	.	.	T.
Contig-CC47	.	G.	AA.	.	C.	C.
Contig-CC46
Contig-CC43
Contig-CC37
Contig-CC14	.	G.
Contig-CC29	.	G.	.	.	T.	.
Contig-CC22	.	.	.	C.	T.	C.
Contig-CC21	.	G.	.	.	T.	.
Contig-CC20	.	G.	.	.	T.	.
Contig-CC16
Contig-CC33

	250	260	270	280	290
Enterobacter sp	TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG				
E_cloacae
Contig-FC2
Contig-CC48
Contig-CC47	TC----
Contig-CC46	.	.	.	T.	C.
Contig-CC43	C.
Contig-CC37
Contig-CC14
Contig-CC29
Contig-CC22
Contig-CC21	C.
Contig-CC20	.	.	.	A.	.
Contig-CC16
Contig-CC33	.	.	.	T.	T.

As posições das seqüências marcadas com um ponto (“.”) indicam identidade com a seqüência de *Enterobacter* sp; bases diferentes do consenso são mostradas.

FIGURA 5. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA PORÇÃO Y1-Y2 16S rDNA DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR PERTENCENTES À FAMÍLIA PSEUDOMONACEAE



	130	140	150	160	170	180
P_oleovorans	TAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGAT					
P_fluorescensCA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC9CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC6CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC40CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC28CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC38CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC23CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC22CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC35CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC5CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC29CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC19CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC16CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-FC12CA.....C.....G..TG.....C.....					
Contig-CC35G.....					
Contig-CC12G.....					

	190	200	210	220	230	240
P_oleovorans	GAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAA					
P_fluorescensG.....T..TC.....					
Contig-FC9GA.....T..TC.....					
Contig-FC6GA.....T..TC.....					
Contig-FC40GA.....T..TC.....					
Contig-FC28GA.....T..TC.....					
Contig-FC38G.....T..TC.....					
Contig-FC23G.....T..TC.....					
Contig-FC22GA.....T..TC.....					
Contig-FC35G.....T..TC.....					
Contig-FC5G.....T..TC.....					
Contig-FC29GA.....T..TC.....					
Contig-FC19GA.....T..TC.....					
Contig-FC16GA.....T..TC.....					
Contig-FC12GA.....T..TC.....					
Contig-CC35C.....					
Contig-CC12C.....					

	250	260	270	280
P_oleovorans	CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA	ACTGAGACACGATCCAG		
P_fluorescensG.....
Contig-FC9G.....
Contig-FC6G.....
Contig-FC40G.....
Contig-FC28G.....
Contig-FC38G.....
Contig-FC23G.....
Contig-FC22G.....
Contig-FC35G.....
Contig-FC5G.....
Contig-FC29G.....
Contig-FC19G.....
Contig-FC16G.....
Contig-FC12G.....
Contig-CC35
Contig-CC12G.....

As posições das seqüências marcadas com um ponto (“.”) indicam identidade com a seqüência de *Pseudomonas* sp; bases diferentes do consenso são mostradas.

Em seguida foi construída uma matriz de similaridade, a partir do alinhamento, com o auxílio da ferramenta *Sequence Identity Matrix* do programa BioEdit (Figuras 6 e 7). Essas matrizes foram construídas separadamente para os dois grupos de isolados (famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonaceae). A matriz representa a proporção de resíduos idênticos de cada par de seqüências em relação ao total de posições comparadas e apresentadas (para obter o resultado em porcentagem, multipliquem-se os valores por 100). O total de posições corresponde ao número de bases nucleotídeas da seqüência mais longa do par. As posições onde falhas foram introduzidas em ambas as seqüências não são consideradas, mas posições com uma falha em uma das seqüências são computadas como diferença.

Essa análise mostrou que as seqüências das estirpes isoladas da cana-de-açúcar são muito parecidas. No caso da família Enterobacteriaceae, as seqüências que apresentaram menor identidade, apresentaram 76% de identidade e as com maior identidade apresentaram 99%. As seqüências das estirpes relacionadas à família Pseudomonaceae apresentaram valores mais contrastantes, variando de 41% a 100% de identidade. Porém, nessa família, várias estirpes apresentaram seqüências idênticas (FC9=FC40;FC9=FC29=FC40;FC12=FC28;FC28=FC10;FC10=FC12;FC18=FC25).

FIGURA 6 - MATRIZ MOSTRANDO A PROPORÇÃO DE IDENTIDADE ENTRE PARES DE SEQUÊNCIAS DE 16S rDNA DOS ISOLADOS DE CANA PERTENCENTES À FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE.

Seq->	Enter	E_clo	FC2	CC48	CC47	CC46	CC43	CC37	CC14	CC29	CC22	CC21	CC20		CC16	CC33
Enter	ID															
E_clo	0,989	ID														
FC2	0,996	0,986	ID													
CC48	0,948	0,942	0,945	ID												
CC47	0,774	0,771	0,774	0,782	ID											
CC46	0,942	0,938	0,938	0,911	0,765	ID										
CC43	0,952	0,948	0,948	0,935	0,778	0,952	ID									
CC37	0,948	0,945	0,945	0,918	0,772	0,979	0,952	ID								
CC14	0,955	0,952	0,952	0,972	0,789	0,938	0,952	0,945	ID							
CC29	0,945	0,938	0,942	0,996	0,782	0,914	0,931	0,921	0,976	ID						
CC22	0,979	0,969	0,976	0,948	0,781	0,921	0,945	0,928	0,948	0,945	ID					
CC21	0,942	0,935	0,938	0,993	0,782	0,918	0,935	0,918	0,972	0,996	0,942	ID				
CC20	0,921	0,914	0,918	0,972	0,795	0,894	0,908	0,897	0,952	0,976	0,921	0,972	ID			
CC16	0,955	0,952	0,952	0,938	0,778	0,948	0,996	0,955	0,955	0,935	0,948	0,931	0,911	ID		0,938
CC33	0,928	0,925	0,925	0,898	0,762	0,979	0,942	0,972	0,925	0,901	0,908	0,905	0,881	0,938	ID	

Os maiores e menores valores são mostrados em negrito. Valores calculados a partir do alinhamento entre as sequências na região Y1-Y2 .

FIGURA 7 - MATRIZ MOSTRANDO A PROPORÇÃO DE IDENTIDADE ENTRE PARES DE SEQUÊNCIAS DE 16S rDNA DOS ISOLADOS DE CANA PERTENCENTES À FAMÍLIA PSEUDOMONACEAE..

Seq->	Paer	Pflu	FC9	FC6	FC40	FC28	FC38	FC23	FC22	FC35	FC5	FC29	FC19	FC16	FC12	CC35	CC12	FC21	FC25	FC18	FC15
C10																					
Paer	ID																				
Pflu	0,906	ID																			
FC9	0,892	0,958	ID																		
FC6	0,913	0,986	0,972	ID																	
FC40	0,892	0,958	1,000	0,972	ID																
FC28	0,902	0,996	0,961	0,989	0,961	ID															
FC38	0,913	0,986	0,972	0,986	0,972	0,982	ID														
FC23	0,916	0,982	0,975	0,989	0,975	0,979	0,996	ID													
FC22	0,902	0,989	0,965	0,989	0,965	0,993	0,982	0,979	ID												
FC35	0,892	0,979	0,978	0,965	0,978	0,975	0,972	0,968	0,968	ID											
FC5	0,913	0,993	0,965	0,993	0,965	0,989	0,993	0,989	0,989	0,972	ID										
FC29	0,892	0,958	1,000	0,972	1,000	0,961	0,972	0,975	0,965	0,978	0,965	ID									
FC19	0,913	0,979	0,979	0,993	0,979	0,982	0,993	0,996	0,982	0,965	0,986	0,979	ID								
FC16	0,920	0,979	0,972	0,993	0,972	0,982	0,986	0,989	0,982	0,965	0,986	0,972	0,993	ID							
FC12	0,902	0,996	0,961	0,989	0,961	1,000	0,982	0,979	0,993	0,975	0,989	0,961	0,982	0,982	ID						
CC35	0,868	0,829	0,822	0,836	0,822	0,826	0,843	0,847	0,826	0,815	0,836	0,822	0,843	0,843	0,826	ID					
CC12	0,927	0,888	0,881	0,895	0,881	0,885	0,902	0,906	0,885	0,875	0,895	0,881	0,902	0,902	0,885	0,940	ID				
FC21	0,410	0,416	0,425	0,416	0,425	0,416	0,413	0,416	0,413	0,420	0,413	0,425	0,416	0,413	0,416	0,396	0,433	ID			
FC25	0,871	0,965	0,971	0,958	0,971	0,968	0,951	0,947	0,965	0,978	0,958	0,971	0,951	0,951	0,968	0,798	0,854	0,418	ID		
FC18	0,871	0,965	0,971	0,958	0,971	0,968	0,951	0,947	0,965	0,978	0,958	0,971	0,951	0,951	0,968	0,798	0,854	0,418	1,000	ID	
FC15	0,909	0,975	0,961	0,975	0,961	0,972	0,989	0,986	0,972	0,961	0,982	0,961	0,982	0,975	0,972	0,854	0,913	0,406	0,940	0,940	ID
FC10	0,902	0,996	0,961	0,989	0,961	1,000	0,982	0,979	0,993	0,975	0,989	0,961	0,982	0,982	1,000	0,826	0,885	0,416	0,968	0,968	0,972
ID																					

Os maiores e menores valores são mostrados em negrito. A sequência FC21 apresentou os menores valores. Isso pode ser explicado pelo fato dessa sequência ser bem menor que as outras (~250 pb). Valores calculados a partir do alinhamento entre as sequências na região Y1-Y2.

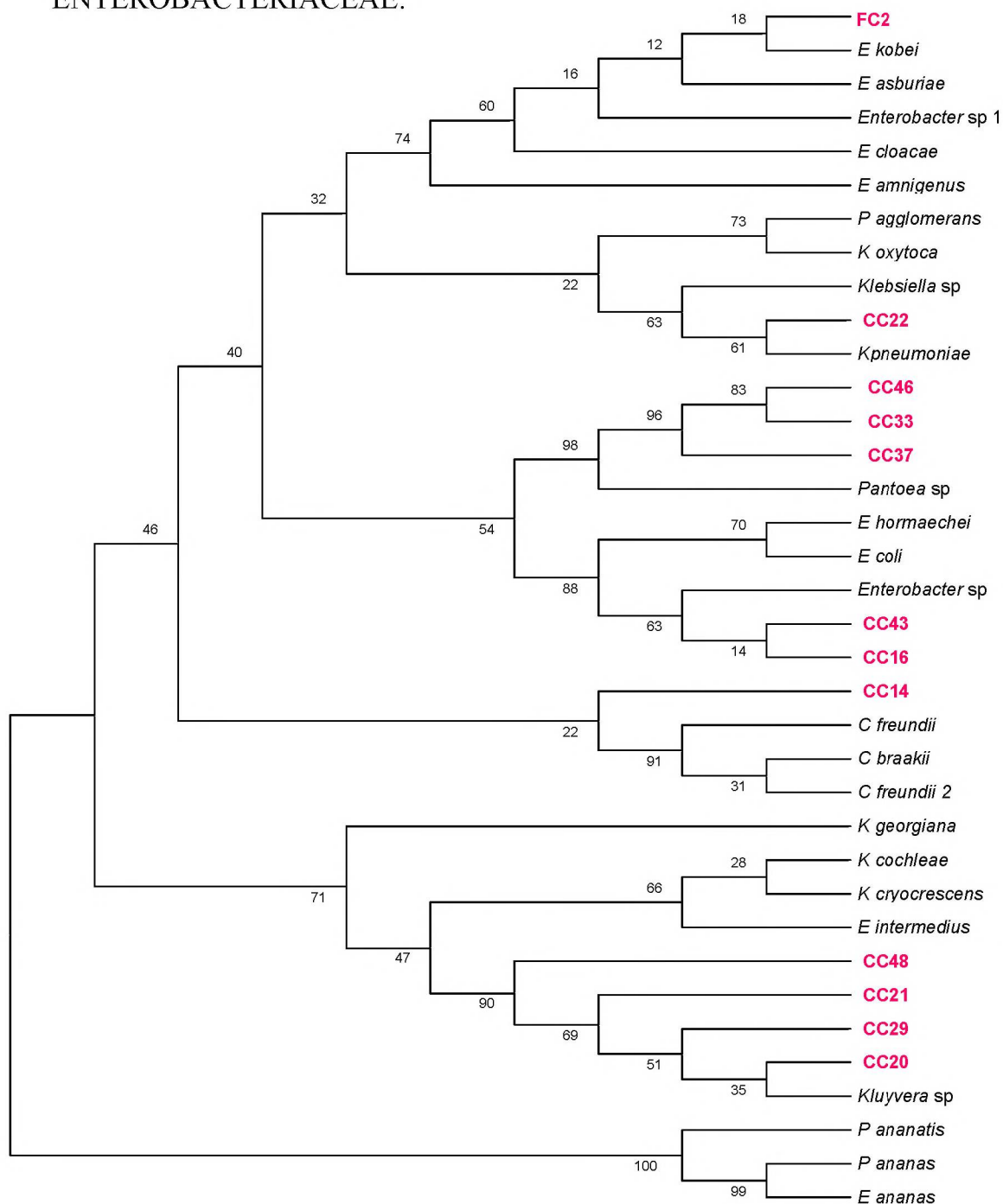
A partir dos alinhamentos de todas as seqüências as árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa MEGA3, utilizando o método *neighbor-joining* com as distâncias calculadas pelo método de JUKES & CANTOR.

A primeira árvore foi elaborada com as seqüências das estirpes identificadas como enterobactérias e as seqüências do Genbank mais similares às das estirpes (Figura 2). Essa análise confirmou os resultados de homologia de seqüência e das provas bioquímicas, porém apresentou inconsistência em alguns ramos (valor baixo de *bootstrap*). As seqüências dos isolados CC43 e CC16 apresentaram valores especialmente baixos (14) e os isolados CC48, CC21 e CC29 não formaram um grupo bem definido. O valor de *bootstrap* é obtido por uma re-amostragem das seqüências que utiliza os dados de alinhamento para testar a reprodutibilidade dos ramos. Quanto maior este valor, mais consistente é o agrupamento que segue à direita do número.

Para melhorar a consistência dos agrupamentos e, conseqüentemente, os valores de *bootstrap*, o grupo das enterobactérias foi subdividido e as árvores re-constituídas. A figura 9 mostra a árvore apenas com seqüências de isolados identificados como dos gêneros *Enterobacter*. Como pode ser observado nessa figura, os valores de *bootstrap* melhoraram, em especial nos ramos entre os isolados CC33 e CC46, e entre os isolados CC43 e CC16, dando maior confiabilidade ao agrupamento obtido.

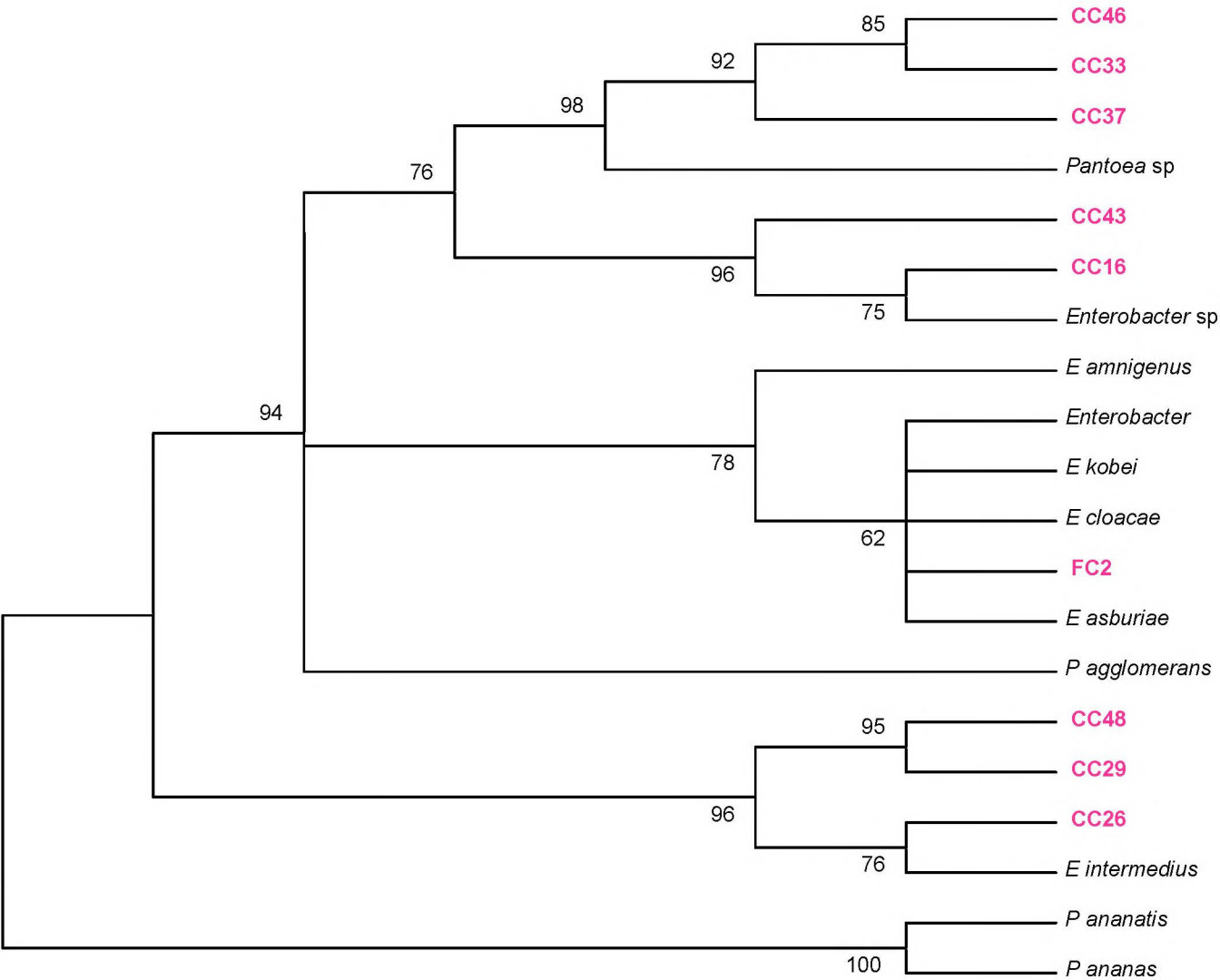
O grupo das *Pseudomonas* foi analisado separadamente, pois é um grupo complexo e difícil de analisar. Somente parte dos isolados da cana-de-açúcar ficou agrupada com seqüências depositadas no banco de dados. Esses foram o FC12, FC28, FC35, FC22, FC5 e FC6. Já os isolados FC19, FC29, FC9, FC40 formaram um grupo próprio, assim como os isolados FC38 e FC23 e os isolados FC35 e FC12.

FIGURA 8 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RECONSTRUÍDA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO Y1-Y2 DO GENE 16S rDNA DOS ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEQUÊNCIAS RELACIONADAS A FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE.



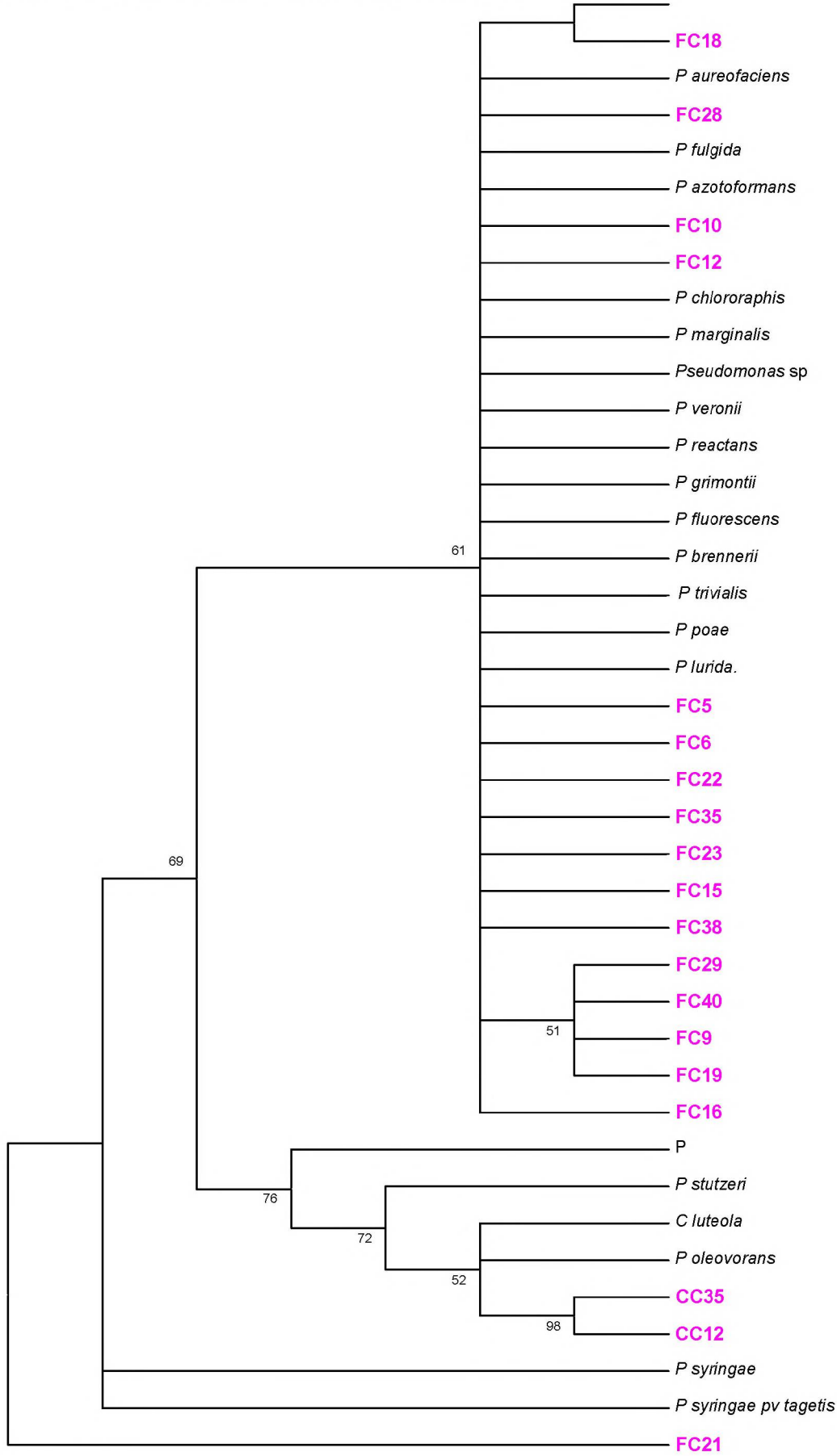
O método usado foi o *neighbor-joining* e as distâncias calculadas pelo método de JUKES e CANTOR. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 2.000 réplicas *bootstrap*.

FIGURA 9 - DETALHAMENTO FILOGENÉTICO DE ESTIRPES RELACIONADAS AO GÊNERO *Enterobacter*. O MÉTODO USADO FOI O DE *NEIGHBOR-JOINING* E AS DISTÂNCIAS CALCULADAS PELO MÉTODO DE JUKES E CANTOR. OS ISOLADOS ESTÃO MOSTRADOS EM ROSA.



O método usado foi o *neighbor-joining* e as distâncias calculadas pelo método de JUKES & CANTOR. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 2.000 réplicas *bootstrap*.

FIGURA 10 - ÁRVORE FILOGENÉTICA RECONSTRUÍDA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rDNA DOS ISOLADOS DE CANA PERTENCENTES À FAMÍLIA PSEUDOMONACEAE E ORGANISMOS RELACIONADOS



O método usado foi o *neighbor-joining* e as distâncias calculadas pelo método de JUKES & CANTOR. Ramos com valores de bootstrap abaixo de 50% são mostrados como não resolvidos.

3.3 ENSAIO DA NITROGENASE

Os isolados de colmo de cana-de-açúcar CC22 (*Enterobacter*), CC26 (*Enterobacter*), CC29 (*Enterobacter*) e CC35 (*Pseudomonas*) apresentaram capacidade de reduzir acetileno a etileno, embora a atividade específica não tenha sido determinada.

4 DISCUSSÃO

As plantas constituem um complexo ecossistema onde comunidades bacterianas interagem continuamente, competindo por nutrientes e água nos diferentes tecidos do hospedeiro. O número de diferentes espécies e a população de uma determinada espécie dentro da comunidade são parâmetros essenciais para definir a sua estrutura e diversidade (LIU et al., 1997). Portanto, o conhecimento da diversidade endofítica é importante para a compreensão da ecologia da comunidade bacteriana na planta. Este conhecimento pode ser aplicado para melhorar a produtividade e facilitar o manejo de culturas de interesse agrônômico.

A maioria dos estudos de bactérias associadas à cana-de-açúcar está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio (CABALLERO-MELLADO & MARTINEZ-ROMERO, 1994; CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988; JAMES & OLIVARES, 1997; DONG et al., 1994; OLIVARES et al., 1996; BODDEY et al., 2003). Estudos de diversidade que compreendam toda a comunidade bacteriana endofítica de colmo e folha da cana-de-açúcar ainda não foram realizados.

Neste trabalho, as bactérias endofíticas do colmo e das folhas da cana-de-açúcar isoladas nos meios DYGS e batata foram caracterizadas, levando-se em consideração uma abordagem polifásica, como VANDAMME propõe (VANDAMME, 1996). As técnicas escolhidas foram o seqüenciamento parcial do 16S rDNA e análise do perfil bioquímico. Vários autores já utilizaram juntamente estas técnicas (VERMA et al., 2001; KIRCHOFF et al., 1997). Esta abordagem permite a caracterização ao nível molecular, que leva em consideração a história evolutiva do organismo, e também proporciona um conhecimento básico de sua fisiologia.

O seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA tem sido utilizado na caracterização da diversidade de organismos endofíticos de várias plantas como

floríferas, batata, arroz, trigo (SESSITCH et al., 2002; IDRIS et al., 2004; VERMA, 2001; GERMIDA et al., 1998) A porção Y1-Y2 deste gene é especialmente importante por ser a região de maior variabilidade do gene (VAN DER PEER . et al., 1996).

As análises da sequência parcial do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos do colmo e da cana-de-açúcar permitiram a sua classificação em cinco grupos filogenéticos. Os dois maiores grupos de sequência são relacionados com a sub-divisão gama das Proteobactérias. Resultados similares foram encontrados em estirpes endofíticas de uva e árvores cítricas, onde *a maioria dos isolados foi classificado* como bacilo gram-negativos pertencentes a essa sub-divisão (BELL et al. 1995; GARDNER et al., 1982).

O grupo I, contendo 14 isolados, está relacionado com a família Enterobacteriaceae e o grupo II , contendo 19 isolados, à família Pseudomonaceae. É interessante notar que ocorre uma preferência por nichos específicos da planta pelos dois grupos de bactérias. Esta preferência *por nichos* já foi relatada anteriormente (MOCALI et al., 2003; SESSITSCH et al, 2002). As enterobactérias foram encontradas principalmente no colmo da cana-de-açúcar, com as exceções de FC2, FC36 e FC39 que foram isoladas da folha da planta. Já a maioria dos endofíticos isolados das folhas foi classificada na família Pseudomonaceae, exceto a estirpe CC12 que, provavelmente, pertence ao gênero *Pseudomonas* e foi encontrada no colmo da cana-de-açúcar.

4.1 BACTÉRIAS ISOLADAS DO COLMO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Os isolados identificados como enterobactérias foram classificados ao nível de gênero tanto utilizando as sequências parciais de 16S rDNA quanto utilizando provas bioquímicas. Embora na maioria das vezes os dois métodos tenham sido concordantes, em alguns casos esses resultados foram ambíguos, resultando na alocação dos isolados em gêneros diferentes pelos dois métodos.

Isso pode ser devido ao fato de que, às vezes, uma mesma espécie de bactéria pode apresentar perfis bioquímico e fisiológico diferentes de acordo com o nicho ocupado, como foi observado com isolados do gênero *Pseudomonas* de raízes de canola (MISKO & GERMIDA, 2002). Além disso, o sistema utilizado (API-20E-BioMeriex) foi desenvolvido para identificação de enterobactérias de interesse clínico, e pode não ser adequado para identificação de organismos endofíticos. Alguns autores já relataram dificuldades na identificação de bactérias com sistemas do tipo API em estirpes clínicas não-usuais ou novos isolados (FONTANA, C. et al., 2005; BUSSE, H. et al., 1996). Apesar dos casos em que a identificação ao nível de gênero não foi conclusiva, as reações que apresentaram resultados positivos nos testes bioquímicos foram consideradas e utilizadas para confirmar os dados de seqüenciamento do 16S rDNA.

Entre os isolados caracterizados do grupo das enterobactérias, o gênero *Enterobacter* foi o mais freqüentemente identificado, representando a maioria no grupo das enterobactérias. *Enterobacter* tem sido encontrado em várias culturas, como por exemplo, em plantas cítricas, batata doce, soja, milho e cana-de-açúcar (ARAÚJO et al., 2002; ZINNIEL, et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; ASIS & ADACHI, 2003; RAJU, 1972; RENNIE, 1982) e algumas estirpes são capazes de fixar nitrogênio.

Os isolados CC16 e CC26 foram classificados como *Enterobacter* na análise da seqüência da região Y1-Y2 do gene 16S rRNA e como prováveis *Pantoea* utilizando o perfil bioquímico. Isso pode ser explicado pelo fato de que algumas espécies de *Enterobacter* foram reclassificadas no gênero *Pantoea* (MURRAY et al., 1997). Além disso, estes dois gêneros possuem um perfil bioquímico muito parecido (MURRAY, 1997; KONEMANN, 2000). O isolado CC22 foi identificado como *Enterobacter* pelo padrão bioquímico e como *Klebsiella pneumoniae* pela análise da seqüência.

Os isolados CC21 e CC47 foram identificados como *Pantoea* em ambos os métodos; esta bactéria foi encontrada, também, por vários outros autores em

plantas cítricas, trevo e cana-de-açúcar (ARAUJO et al., 2002, STURZ et al., 1999; LOIRET et al., 2004).

Outros gêneros também foram identificados com base na similaridade do gene 16S rDNA e perfil bioquímico. O isolado CC20 foi identificado por ambos os critérios dentro do gênero *Kluyvera* sp. Estirpes deste um gênero são encontrados com frequência em solos (BURD et al., 1998).

Outros cinco isolados não estão relacionados com a sub-divisão gama proteobacteria. São os isolados de colmo CC27 e de folha FC24, que foi identificado como *Curtobacterium* sp, o CC18 e o CC23, identificados como *Staphylococcus* e o CC38, identificado como *Brevibacillus* sp.

Curtobacterium sp já foi encontrado em laranja, uva, em plantas hiper-accumuladoras de metais e em canola (ARAUJO et al., 2002; BELL et al., 1995; IDRIS et al., 2004; GERMIDA et al., 2002). A espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* é encontrada em rizosfera de pinus (BENT, 1998; CHANWAY, 1998).

Estirpes de *Staphylococcus* foram isolados de brócolis e de ambiente alcalino não-salino (TIAGO et al., 2004; PADAGA et al., 2000).

Brevibacillus spp têm sido encontrados em solos contaminados cádmio e em associação com soja (VIVAS et al., 2003; SARKAR, 2002).

4.2 BACTÉRIAS ISOLADAS DA FOLHA CANA-DE-AÇÚCAR

O principal grupo de isolados de folhas de cana-de-açúcar foi classificado como pertencente à família Pseudomonaceae. Bactérias desta família são capazes de colonizar todas as superfícies das plantas (ESPINOSA & URGEL, 2004) e foram encontradas colonizando endofiticamente várias espécies vegetais (SESSITCH et al., 2002; VERMA et al., 2001; ZINNIEL et al., 2002; MOCALI et al., 2003).

A caracterização pelo perfil fisiológico das estirpes isoladas da folha da

cana-de-açúcar não permitiu a identificação do provável gênero, com exceção das estirpes FC18 e FC26, mas os classificou como bacilos gram negativos não-fermentadores da glucose, citicromo c oxidase negativas. Essa classificação é compatível com a descrição de várias espécies de *Pseudomonas* (WEYANT, 1996).

Os tecidos da superfície da planta sofrem mudanças drásticas das suas condições físicas constantemente (temperatura, umidade, irradiação UV). Essa situação de estresse impõe uma restrição no crescimento de populações bacterianas nas folhas (HIRANO & UPPER, 2000). Os exsudatos da folha consistem de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos que exigem dos microrganismos uma versatilidade metabólica (MERCIER & LINDOW, 2000). Esta versatilidade metabólica é característica de endofíticos do gênero *Pseudomonas* (MISKO & GERMIDA, 2002).

Em folhas de planta da batata doce também foram encontradas *Pseudomonas* (ELLIS et al., 1999). Microrganismos deste grupo também já foram encontrados no rizoplane de canola e de trigo, e em rizosfera e endoriza de batata (GERMIDA et al., 1998; BERG, et al., 2005). Espécies de *Pseudomonas* fixadoras de nitrogênio já foram isoladas de arroz e capim das dunas (VERMA et al., 2001; DALTON et al., 2004).

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA UTILIZADOS

A identificação bacteriana foi, durante muito tempo, baseada em caracteres fisiológicos e bioquímicos. Porém, a identificação ao nível molecular ganhou cada vez mais espaço, principalmente depois do trabalho de Woese em 1987. Atualmente, métodos moleculares constituem a principal abordagem para identificação de microrganismos.

O objetivo desse estudo foi caracterizar a diversidade de bactérias

endofíticas de cana-de-açúcar, e para isto foram utilizadas duas abordagens diferentes: a análise de sequência da porção Y1-Y2 do gene 16S rDNA e do perfil bioquímico e fisiológico. Utilizando essas duas abordagens, foi possível propor o gênero da maior parte dos isolados. Porém, em alguns casos ocorreram inconsistências nos resultados das duas abordagens. Estas incompatibilidades ocorreram, provavelmente, devido a:

- 1) As seqüências depositadas nos bancos de dados podem não refletir toda a diversidade existente.
- 2) A região de seqüência analisada pode não ser longa ou variável o suficiente para identificação desse grupo de bactéria.
- 3) O sistema de identificação bioquímico utilizado é indicado para isolados clínicos, podendo não abranger um número suficiente de características para identificação. Além disso, a colonização endofítica pode ter selecionado estirpes com características fisiológicas incomuns.

4.4 POTENCIAL DOS ISOLADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

As bactérias podem apresentar diversos efeitos no desenvolvimento da planta hospedeira (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Por exemplo, podem ser utilizadas como biofertilizantes, aumentando a produtividade da cultura através de uma combinação de mecanismos que podem incluir fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, aumento da disponibilidade de nutrientes do solo e controle de doenças (COCKING, 2003; HALLMANN, 1997; KENNEDY, 1999). É possível que os organismos caracterizados neste estudo tenham potencial para serem usados nesses casos. Por exemplo, o desenvolvimento de doença por *Erwinia carotovora*, uma bactéria patogênica, pode ser inibido por inoculação de *Pseudomonas* sp, *Curtobacterium luteum* ou *Pantoea agglomerans* (REITER, 2002). Outros estudos mostram que *Enterobacter* promove de crescimento vegetal, *influencia na infecção por nematodeos* e é capaz de fixar nitrogênio

(KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; HALLMANN, J. et al., 1998).

Pantoea também está relacionada com a promoção do crescimento em soja e controle de *Erwinia* (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; STURZ et al., 1999) e *Khuyvera ascorbata* diminui toxicidade de níquel em plantas (BURD et al., 1998).

O *Curtobacterium* spp pode auxiliar na absorção de níquel em solos com esse elemento (IDRIS et al., 2004), e a espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* tem um papel importante na indução da resistência em plantas cítricas à clorose cítrica variegada, causada por *Xyllela fastidiosa* (ARAUJO et al., 2002).

Populações endofíticas de *Pseudomonas* podem estar relacionadas com o desenvolvimento dos fungos *Verticillium longisporum* e *Verticillium dahliae* (GRANÉR et al., 2003; BERG et al. 2005) e a espécie *Pseudomonas aeruginosa* pode inibir infecção de nematodeo em tomate (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003).

As estirpes CC22, CC26, CC29 identificados como pertencentes ao gênero *Enterobacter* e CC35 ao gênero *Pseudomonas* foram capazes de reduzir aceliteno a etileno.

Os endofíticos fixadores de nitrogênio mais freqüentemente isolados de cana-de-açúcar são *Herbaspirillum seropedicae*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum brasilense* (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988; OLIVARES, 1997; TEJERA et al., 2004). Estes organismos não foram encontrados no presente estudo. Nos estudos citados realizados com *Herbaspirillum seropedicae*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum brasilense*, utilizam-se meios mínimos específicos para bactérias diazotróficas como NFb, JNFb para o isolamento. No presente estudo os meios DYGS e batata foram utilizados. Essa pode ser a razão do não aparecimento dos organismos diazotróficos acima citados. Além disso, nem todas as estirpes isoladas do colmo e das folhas da cana-de-açúcar pela Dra. Claudia Didonet foram identificadas. Portanto, a diversidade pode ser maior do que a aqui apresentada.

A colonização conjunta de plantas por essas bactérias pode ter efeito sinérgico negativo sobre crescimento vegetal. BACILIO-JIMENEZ e colaboradores (2001) observaram que bactérias endofíticas inibem e a promoção do crescimento provocada por *Azospirillum brasilense* (BACILIO-JIMENEZ et al, 2001).

Os isolados similares à *Curtobacterium* spp e *Brevibacillus* sp, aparentemente ainda não foram descritos em cana-de-açúcar, e seu potencial como fixadores e como promotores ainda não foi explorado na cana-de-açúcar.

5 CONCLUSÕES

A caracterização bioquímica e molecular dos isolados endofíticos de colmo e folha de cana-de-açúcar revelou uma grande diversidade de bactérias colonizando esta planta.

Análises da sequência de nucleotídeos da região Y1-Y2 do gene 16S rDNA permitiram separar os 38 isolados endofíticos em cinco grupos. São eles: grupo I, relacionado com a Família Pseudomonaceae; grupo II, com a Família Enterobacteriaceae; Grupo III, com a Família Staphylococcaceae; Grupo IV, com a Família Paenibacillaceae e Grupo V, relacionado com a Família Microbacteriaceae.

A classificação baseada em identidade de sequência na maioria das vezes foi consistente com as análises do perfil bioquímico e fisiológico.

Das 23 estirpes isoladas de colmo de cana-de-açúcar, 19 são relacionadas com a família Enterobacteriaceae. Entre estas estirpes o gênero *Enterobacter* foi o mais frequentemente isolado, sendo que estirpes relacionadas com *Pseudomonas*, *Kluyvera*, *Pantoea* e *Staphylococcus* foram também encontrados.

Na folha da cana-de-açúcar foram encontrados predominantemente estirpes relacionadas com o gênero *Pseudomonas*, mas também foram isoladas estirpes relacionadas com os gêneros *Pantoea* e *Enterobacter*.

As estirpes CC27, FC24 e CC38, as duas primeiras relacionadas com *Curtobacterium* sp e a terceira com *Brevibacillus* sp, são os primeiros representantes desses gêneros isolados da cana-de-açúcar.

Os organismos caracterizados nesse estudo têm potencial para serem usados no controle biológico de pragas, manipulação de população endofítica e fixação biológica de nitrogênio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS JH, HARRIS RF. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annu Rev Phytopathol.**, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARAUJO, W.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, oct. 2002.

ASIS, C.A. & ADACHI, K. Isolation of endophytic *Pantoea agglomerans* and nonzotrophic *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 19-23, 2003.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, 2000. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full3>.

AZEVEDO, J. L. et al. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. Em: **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Serafini et al (eds). EDUCS, 2002.

BACILIO-JIMÉNEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M. V.; PEREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZANTENA, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 167-172, 2001.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 324-332, 2001.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-

associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93.

BALDANI J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J.. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer academic publishers, 2000

BECKING, J.H. Identification of the endophyte of *Dryas in Rubus* (Rosaceae). **Plant and Soil**, v.78, p. 105-28, 1984.

BELL, C.R., DICKIE, G.A., HARVEY, W.L.G. and CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 46-53, 1995.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, n. 10, p. 980-988, 1998.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A>; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 215-229, 2004.

BERGSMA-VLAMI, M. et al. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 993-1003, 2005.

BIONDI, N. et al. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. **Appl Environ Microbiol.**, v. 70, n. 6, p. 3313-3320, 2004.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in Seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 43-86.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CABARELLO-MELLADO; MARTINEZ-ROMERO. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1532-1537, 1994.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BÂ, A.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. CONSED: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998

CAVALCANTE, V.A; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-21, 1988.

Cocking, C. E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**. V. 252, n. 1, p.169 – 175, 2003

CONN, V. M.; FRANCO, M. M. F. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

COSTA, J. L.; PAULSRUD, P.; RIKKINEN, J.; LINDBLAD, P. Genetic diversity of *Nostoc* symbionts endophytically associated with two bryophyte species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4393-4396, 2001.

CRUZ, L.M. Caracterização e análise filogenética molecular de novos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio. Curitiba, 2001. 168p. **Tese** (Doutorado em Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

DALTON, D.A.; KRAMER, S.; AZIOS, N.; FUSARO, S.; CAHILL, E.;

KENNEDY, C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*ammophila arenaria* and *elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 469-479, 2004.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e cultura**, v. 44, n. 5, 1992.

DÖBEREINER, J.; BODDEY, R. M. Nitrogen fixation in association with gramineae. **Current Perspectives in Nitrogen Fixation**, Gibson, A. H; Newton, W.E. (eds), Canberra: Aust.Acad.Sci., p. 305-312, 1981.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 1139-1147, 1994

DOWNING, K. J. ;LESLIE, G.; THOMSON, J. A. et al. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cryIAc7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2804-2810, 2000.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5284-5293, 2001.

ELLIS, R. J.; THOMPSON, I. P.; BAILEY, M. J. Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p. 345-356, 1999.

EMBRAPA, Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia, p. 1-39, 1999.

ESPINOSA-URGEL, M. Plant-associated *pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. **Plasmid**, v. 52, p. 139-150, 2004.

EWING B, HILLIER L, WENDL MC, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p.175-85, 1998.

- FONTANA, C.; FAVARO, M.; PELLICIONI, M.; PISTOIA, E. S.; FAVALLI, C. Use of Microseq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 615-619, 2005.
- GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.
- GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D. Taxonomy diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biol. Fertil. Soils**, v. 33, p. 410-415, 2001.
- GRANÈR, G.; PERSSON, P.; MEIJER, J.; ALSTRÖM, S. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 269-276, 2003.
- HALMMAN et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** V. 43, p. 895-914, 1997.
- HALMMAN. J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODIGUEZ-RABANA, L.; KLOEPPER, J. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil. Biochem.**, v. 30, n. 7, p. 925-937, 1998.
- HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated organisms. **Microb. Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.
- HIRANO S.S, UPPER CD. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 64; n.3, p.624-53, 2000.
- HUANG, X; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, 868-877, 1999.
- HUGENHOLTZ, P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J Bacteriol.**, v. 180, n. 18, p. 4765-74, 1998.
- IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W. W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2667-77, 2004.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Herbaspirillum, and endophyte diazotrophic colonizing vascular tissue in leaves of sorghum bicolor L. Moench. **J. Experimental Botany**, v. 48, n. 308, 785-797, 1997

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** , v. 65, p. 197-209, 2000.

JASPERS, E.; OVERMANN, J. Ecological significance of microdiversity. Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4831-4839, 2004.

JOLY, H. B. Introdução à taxonomia vegetal. 11 ed., São Paulo, Editora Nacional, 1993.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environment**, v. 74, p.65-76, 1999.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.**, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLOEPPER, J. W. et al. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopathology**, v. 82, p. 726-727, 1992.

KONEMAN, E. W.; ALLENS, S. P.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W. **Clinical Microbiology**. 5 ed. MEDSI, 2001

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 55-59, 2004.

LEE S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter*

diazotrophicus strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **J Bacteriol**, v. 186, n. 16, p. 5384-91, 2004.

LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **J Appl Microbiol.**, v. 97, n. 3, p.504-11, 2004.

LOVELL, C. R.; PICENO, Y. M.; QUATTRO, J. M.; BAGWELL, C. E. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p.3814-3822, 2000.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can . J. Microbiol.**, v. 37, p. 549-553, 1991.

M. WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. Location and Survival of Leaf-Associated Bacteria in Relation to Pathogenicity and Potential for Growth within the Leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1435-1443, 1999.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. H. (ed.). **Mammalian protein Metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

MENGONI, A. et al. Fluctuaction of endophytic bacteria and phytoplasmosis in elm trees. **Microbiol. Res.**, v. 158, p. 363-369, 2003.

MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 66, n.1,p.369-374,2000.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 105-114, 2003.

MURRAY, P. R.; BAROW, E. J.; PFALLER, M. A.; TEWOVER, F. C.; YOLKEN, K. H. **Clinical Microbioly**, 7 ed. ASM Press, Washington D. C., 1999.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2764-2769, 1996

NEWMAN DK, BANFIELD JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, n.10, v. 296, p.1071-7, 2002.

NUNEZ WJ, COLMER A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Appl Microbiol.**, v. 16, n. 12, p.1875-8, 1968.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol**, n. 135, p. 723-737, 1997.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L. BALDANI, VL.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. et al. Ocurrance of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominatly of Gramineae. **Biol. Fertil Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

PACE NR., A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-40, 1997.

PADAGA, M.; HEARD, G. M.; PATON, J. E.; FLEET, G. H. Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 15-24, 2000.

POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cam. Univ. Press, 1982.

QUADT- HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 577-582, 1997.

QUADT- HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 254-259, 1997.

RAMU CHENNA, HIDEAKI SUGAWARA, TADASHI KOIKE, RODRIGO

- LOPEZ, TOBY J. GIBSON, DESMOND G. HIGGINS AND JULIE D. THOMPSON. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, 3497-3500, 2003.
- REIS, V. M. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, n.3, p. 227-247, 2000.
- REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Ewinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p.2261-2268, 2002.
- RAJKUMAR, M.; LEE W. H.; LEE K.J. Screening of bacterial antagonists for biological control of Phytophthora blight of pepper. **J Basic Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 55-63, 2005.
- SABARATNAM, S.; BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 69, n. 2, p. 1220-1228, 2003.
- SAHAY, N. S.; VARMA, A. *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 181, n. 2, p. 297-302, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual 2 ed. New York, Cold Spring, Harbor laboratory, 1989.
- SANTIAGO, V. T.; BRAVO, M.; DAEZ, G., VENTURA, V.; WATANABE, I.; APP, A. Effect on n-fertilizers, straw and dry follow on the nitrogen balance of a flooded soil planted with rice. **Plant and Soil**, 93:405-11, 1992.
- SARKAR, P.K.; HASENACK, M.J.R.;NOUT. Diversity and functionality of Bacillus and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala). **International Journal of food Microbiology**, v. 77, p. 175-186, 2002.
- SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.; Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. EDUCS, Caxias do Sul, 2002.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p. 23-32, 2002.

SIDDIQUI, I. A. & SHAUKAT, S.S. Effects of *pseudomonas aeruginosa* on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1359-1368, 2003.

STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.67, n. 4, p.491-502, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biol. Fertil. Soils**, v. 25, p. 13-19, 1997.

STURZ A.V.; CHRISTIE B.R.; MATHESON B.G.; ARSENAULT W.J.; BUCHANAN, N.A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, vol. 48, no. 3, p. 360-369(10), 1999.

VIVAS, A.; BAREA, J.M.; AZCO, R. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. **Environmental pollution**, v. 134, p. 257-266, 2005

TIAGO, I.; CHUNG, A. P.; VERISSIMO, A. Bacterial diversity in a nonsaline environmental: heterotrophic aerobic populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7377-7387, 2004.

TORSVIK V, OVREAS L, THINGSTAD TF. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n. 296; p. 1064-6, 2002.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. et al. Remarkable N₂ – fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

URETA, A; ALVAREZ, B.RÁMON, A.; VERA, M. A.; MARTINÉZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil.**, v. 127, p. 271-+277, 1995.

VAN DE PEER, Y; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 17, p. 3381-3391, 1996.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.;

SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VERMA, C. S.; SINGH, A.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Endophytic ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 425-429, 2004.

WEISBURG WG, GIOVANNONI SJ, WOESE CR. The *Deinococcus-thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. **Syst Appl Microbiol.** v.11, p.128-34, 1989.

WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 137-144, 2001.

WOODSON SA, LEONTIS NB. Structure and dynamics of ribosomal RNA. **Curr Opin Struct Biol**, v.8, n.3, p. 294-300, 1998.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H. J. Biological Nitrogen Fixation, New York, London, Chapman e Hall, 1992.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **Eur J Biochem.**, v. 259, n. 3, p. 572-6, 1999.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

